



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica

**Papel de las prostaglandinas producidas por la
ciclooxigenasa-2 en la resistencia a la insulina asociada a
la enfermedad hepática grasa no alcohólica**

Omar Motiño García-Miguel

Tesis doctoral

Madrid

2016

Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina



Universidad Autónoma de Madrid



**Papel de las prostaglandinas producidas por la
ciclooxigenasa-2 en la resistencia a la insulina asociada a
la enfermedad hepática grasa no alcohólica**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por:

Omar Motiño García-Miguel

Madrid, 2016

Licenciado en Biología, para optar al grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid

Dirigida por:

Dra. Paloma Martín Sanz

Dra. Noelia Agra Andrieu

Realizada en:

Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols

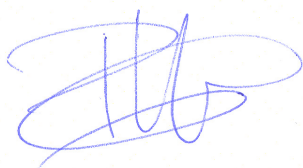


La directora **Dra. Paloma Martín Sanz** y la codirectora **Dra. Noelia Agra Andrieu** certifican que **Omar Motiño García-Miguel**, licenciado en Biología por la Universidad de Alcalá, ha realizado el trabajo de investigación titulado: **“Papel de las prostaglandinas producidas por la ciclooxigenasa-2 en la resistencia a la insulina asociada a la enfermedad hepática grasa no alcohólica”** bajo su dirección en el Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Revisado el presente trabajo, expresan su conformidad para la presentación del mismo considerando que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente.

Firmado, para que conste a todos los efectos, en Madrid, a 18 de Diciembre de 2015.

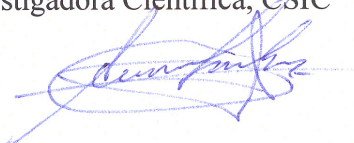
Fdo. **Paloma Martín Sanz**
Directora de Tesis
Investigadora Científica, CSIC



Fdo. **Noelia Agra Andrieu**
Codirectora de Tesis
Investigadora Contratada, CSIC



VºBº Tutora
Aurora Sánchez Pacheco
Investigadora Científica, CSIC



Esta memoria de tesis ha sido realizada con ayuda de la Beca Formación de Personal Investigador (FPI) con referencia BES-2011-048486 en el Departamento de Bioquímica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols CSIC-UAM.

A mis padres Ana y Ventura

A mi hermana Sandra

A mi familia

A Sheila

A Paloma, Noelia y Daniel

***“Existen dos superpotencias en el mundo; una es
Estados Unidos; otra, eres tú”***

José Saramago

***“Un científico debe tomarse la libertad de plantear
cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación,
de corregir errores”***

Julius Robert Oppenheimer

Agradecimientos

Tengo 30 años, soy el fruto de un sueño que escribieron mis padres. Ellos me brindaron la oportunidad de empezar una maravillosa vida, y aunque hasta la actualidad el camino no ha sido nada fácil, siempre me he visto acompañado de la familia, los amigos, los compañeros, los profesores, etc. Todos ellos han hecho que yo esté ahora mismo escribiendo esta tesis. Probablemente no dudaría en embarcarme en este mismo camino si tuviera que retroceder en el tiempo.

En primer lugar, agradezco infinitamente a la Dra. Paloma Martín Sanz por darme la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio. Siempre te has ofrecido de manera altruista y cercana a enseñarme tus conocimientos, que me han hecho mejorar cada día a nivel profesional y personal. Tu dirección y supervisión tienen como recompensa este trabajo.

A mi gordito holgazán preferido, che Daniel Francés, que es parte esencial de esta tesis, y que desde el primer día que le conocí, siempre ha mostrado su entera disposición a enseñar cualquier persona, en cualquier lugar y momento. Además, si por algo vos se caracteriza, es por saber escuchar antes que hablar, no todo el mundo tiene ese don. Has hecho que tenga, en sintonía con otros, un pensamiento crítico. Darte las gracias por compartir alegrías (no solo las futbolísticas), penas, comidas, *skype*... En definitiva, fue, es y será enriquecedor ser tu amigo.

Sin duda, a Noelia Agrá, Noelimus, no le puedo estar más agradecido por ayudarme incansablemente en este proyecto, también has sido parte imprescindible de esta tesis. Has puesto a mi disposición tus conocimientos, has luchado y te has esforzado por enseñarme a trabajar. No solo me has tendido tu mano a nivel laboral, también en lo personal.

Y por supuesto, a mi gran amigo Pipope, el gringo Luis Alberto Castro, que desde que nos conocimos, ha estado a mi lado para apoyarme científica y personalmente. Tengo en mi mente esos bocatas de jamón ibérico de bellota, el pozole, la canción de las navidades orquestada por Daniel Francés, las interminables charlas de política hispano-mexicana, incluso los chutes de coca cola, demasiados recuerdos. Le vale madre la balacera amigarse conmigo. Muchas gracias desde el otro lado del charco, aquí tienes un amigo.

También me gustaría agradecer efusivamente al Profesor Lisardo Boscá por sus aportaciones al proyecto, su amabilidad y optimismo que transmiten energía positiva, y por sus interesantes anécdotas. Y a la Dra. Marina Mojena, que se ofrece desinteresadamente a ayudarte dándote siempre sabios consejos.

Gracias a la Dra. Marta Casado y al Dr. Rafael Mayoral por sus numerosas aportaciones al proyecto, siempre están en disposición de ayudarte en lo que sea.

Agradecimientos

Gracias al Dr. Carmelo García, que siempre ha estado dispuesto amablemente a echarnos una mano en nuestros proyectos: facilitarnos muestras, apoyarnos técnicamente, etc.

Gracias a la Dra. Ángela María Martínez, a la Dra. Pilar Valdecantos y a la Dra. Virginia Pardo, por darme buenos consejos, apoyo logístico y técnico.

A todos los compañeros del laboratorio B-11, a los que ahora están o no, con los que he vivido grandes momentos en el trabajo y fuera de él, por ayudarme y apoyarme en todo, por resolverme y explicarme dudas, por transmitirme vuestros conocimientos, y por hacerme más fácil mi trabajo en lo que al fin y al cabo es nuestra segunda casa. Gracias a María Pimentel (Pimentel) por su risa contagiosa y por pegarme el “hay que ver cómo eres”; a Verónica Terrón por cambiarme el correo tan vilmente (omonito); a Patricia Prieto mi vecina de enfrente que siempre me regaña cuando suena mi majestuosa lírica voz; a María Fernández (“Fernández”) con la que tantas charlas políticas hemos tenido y tantas veces le he susurrado “ese paper, María Fernández, ese paper”; a Silvia González (la chachalaca valenciana) y a Marta Paz (Martaña) por aguantar firmemente mis bromas, a Rocío Brea que siempre está para echarte un cable; a mi estimado César Eduardo Rosales (el Vato), que siempre que te le encuentras está hablando con alguien (cuenta con incalculables conocidos, compañeros y amigos), gracias por estar siempre dispuesto a escuchar y apoyarme en todo; y por ser la última en llegar, a mi ahijada Marina Domínguez, por aguantar bromas, por las alegrías, disgustos y confesiones, espero que siempre estés cerca.

A Myriam Gorospe no le puedo estar más agradecido por brindarme la oportunidad de realizar una estancia breve en su laboratorio en el Intramural Research Program-NIH-NIA, Baltimore. Fue enriquecedor estar en tu laboratorio, donde descubrí la calidad humana y científica de tus proyectos llevados a cabo por tu equipo: Kotb Abdelmohsen, Je-Hyun Yoon, Amaresh Panda, Yannis Grammatikakis, Lynn Wu, Jennifer Martindale, y J.Kim. También hacer mención a mis compañeros y amigos que conocí en mi estancia, en especial a Irene Alfaras y Yannis Grammatikakis, con los cuales viví grandes momentos en Baltimore. Y sin dudarlo, a mi amiga Joan Jones que me acogió con los brazos abiertos en su casa, me enseñó los rincones de la ciudad y cultura de los lugareños, compartió horas de compras y charlas...De todo corazón, muchas gracias a todos por hacer mi estancia una grata experiencia personal y profesional.

Agradecer al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la Universidad Autónoma de Madrid, cuyas infraestructuras han permitido desarrollar este trabajo, y al personal de todos

sus servicios, tanto los de apoyo a la investigación y otros laboratorios como los administrativos, que me han facilitado en gran medida el trabajo diario.

Darles las gracias a mis amigos en la Universidad de Alcalá (UAH), en especial Juan Francisco Rodríguez (Fuanfan), María González (Maripuri express) y Cristina Rodríguez (Crispy Chicken), por los maravillosos momentos vividos durante la carrera y fuera de ella. Gracias a mis amigos que conocí cuando empecé a trabajar en la UAH, Ana y Mali, y en particular a Raúl Alelú y Ariel Ernesto Cariaga, con los que compartí, comparto y compartiremos desayunos y comidas, discusiones científicas y políticas, risas, penas, etc. Siempre hemos querido e intentado “arreglar” el mundo, pero eso es una ardua tarea. Gracias a los dos por enseñarme a tener un pensamiento crítico, sois grandes. También quiero agradecer al Dr. Ricardo Bosch, Dra. Begoña Colas y a la Dra. Pilar Ruíz por ofrecerme la oportunidad de trabajar en sus laboratorios en la UAH, cuando apenas era un novato.

A todos mis otros amigos no científicos (Carlos, Rubén, Antonio, José, Kini, Sison, Dani, Pablo, Raúl, Dennis, y Jaime) y sus compañeras, con los me siento afortunado de compartir miles de experiencias, algunas de ellas, si bien recuerdo, de la época de la infancia-adolescencia. Y por supuesto a mi inseparable amigo Borja, con el cual comparto mi vida desde casi que nacimos; me siento orgulloso de tenerte a mi lado, para mí siempre serás mi hermano.

A mi compañera de viaje, Sheila, porque eres la luz que ilumina mi vida. Muchísimas gracias por lo que vivimos día a día, por comprenderme y apoyarme en los malos y en los buenos momentos, por tu enorme paciencia e inmenso cariño. Gracias a tus padres, que siempre han estado ahí para apoyarnos y cuidarnos en cualquier situación.

Y finalmente, quiero dar las gracias a mi familia, que siempre me han dado un incalculable afecto y cariño, me han cuidado y enseñado a ser lo que soy. Gracias a mis abuelos y abuelas, a todos mis tíos y tías, y a mis primos y primas, y a mi cuñado. A mi abuela María, que es como una madre, que nos ha enseñado a ser lo que somos, que se ha desvivido y ha luchado ferozmente para que cada uno de nosotros seamos felices. A mi tío Luis, que siempre se ha esforzado para conseguir lo mejor para todos. Mi más profundo agradecimiento a mis padres y a mi hermana, por enseñarme a luchar por lo que quiero, por cuidarme y por apoyarme incondicionalmente. Y gracias a todos los que están en nuestros recuerdos.

Un merecido agradecimiento para todos, gracias por compartir mi vida.

Resumen/Abstract

La ciclooxigenasa (COX) es la enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de prostanoïdes, entre ellos las prostaglandinas (PGs). Existen dos isoformas de COX, COX-1 que se expresa constitutivamente en diversos tejidos, y COX-2 que es inducible por múltiples estímulos como factores de crecimiento, estímulos pro-inflamatorios y estrés celular. Los hepatocitos adultos son incapaces de inducir la expresión de COX-2 independientemente de los factores pro-inflamatorios, aunque se ha demostrado que, después de la regeneración hepática por hepatectomía parcial, en la hepatitis viral, y en líneas celulares de hepatoma y carcinoma hepatocelular (CHC), los hepatocitos son capaces de expresarla.

La resistencia a la insulina (RI) participa en la fisiopatología de enfermedades relacionadas con la obesidad como la diabetes mellitus tipo 2 y la enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA). Además, la RI está asociada con un estado de inflamación crónica leve que contribuye significativamente a su desarrollo. Trabajos previos han implicado a COX-2 en la fisiopatología de la obesidad y RI con resultados contradictorios. Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos estudiar la implicación de COX-2 en un modelo de daño hepático, RI y alteración de la homeostasis del metabolismo inducido por una dieta rica en grasa (HFD) en ratones transgénicos para COX-2 humana (Tg). Además, se ha analizado el efecto de COX-2 en la modulación de la expresión de los microARNs (miARNs) y su posible implicación en la patología hepática en relación con la RI y EHGNA.

Nuestros resultados muestran que la expresión de COX-2 en el hepatocito protege frente a la RI, esteatosis hepática y adiposidad inducida por una dieta HFD en ratones, debido a una mayor sensibilidad a la insulina y mayor tolerancia a la glucosa provocada por activación de AKT y AMPK en el hígado, a una reducción de citoquinas pro-inflamatorias y de lípidos hepáticos y plasmáticos asociados a una mayor oxidación mitocondrial, y a un aumento del gasto energético e inducción de la termogénesis. Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren un nuevo mecanismo por el cual la expresión de COX-2 en el hepatocito protege frente a la RI. Las PGs dependientes de COX-2 reducen los niveles de miR-23b, miR-146b y miR-183 mediante la estabilización de DDX5 vía PI3K/AKT/p300. Además, COX-2 inhibe la biogénesis de dichos miARNs mediante la modulación de la actividad del complejo Drosha a través de la asociación física con DDX5. Consecuentemente, aumenta la expresión de su gen diana, IRS1, clave en la señalización de la insulina. También, se ha demostrado que existe una correlación inversa entre la expresión de COX-2 y los miARNs en pacientes con esteatosis hepática no alcohólica.

Cyclooxygenase (COX) is the enzyme that catalyzes the limiting step in prostanoid biosynthesis pathway, including prostaglandins (PGs). There are two isoforms of COX; COX-1 is constitutively expressed in many tissues, and COX-2, which is induced by variety stimuli such as growth and pro-inflammatory factors, and cell stress. Adult hepatocytes fail to induce COX-2 expression, regardless of the pro-inflammatory factors used, however, after partial hepatectomy for liver regeneration, in viral hepatitis, hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma (HCC), the hepatocytes are able to express it.

The insulin resistance (IR) is involved in the pathophysiology of obesity-related diseases such as type 2 diabetes mellitus and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). In addition, the IR is associated with a state of mild chronic inflammation that contributes significantly to its development. Previous studies have implicated COX-2 in the pathophysiology of obesity and IR with contradictory results. Given this background, we studied the involvement of COX-2 in a model of liver damage, IR and altered metabolism homeostasis induced by a high fat diet (HFD) in transgenic mice for human COX-2 (Tg). Moreover, we analyzed the effect of COX-2 in modulating the expression of microRNAs (miRNAs) and their possible role in liver pathology related to IR and NAFLD.

Our results show that the expression of COX-2 in hepatocytes protects against IR, hepatic steatosis and adiposity induced by HFD in mice, due to increased insulin sensitivity and glucose tolerance induced by AKT and AMPK activation in the liver, a reduction of pro-inflammatory cytokines, and liver and plasma lipids associated with an enhanced mitochondrial oxidation, and increased energy expenditure and induction of thermogenesis. Furthermore, the results suggest a novel mechanism by which the expression of COX-2 in hepatocytes protects against IR in liver cells. PGs derived from COX-2 reduce the levels of miR-23b, miR-146b and miR-183 by stabilizing DDX5 via PI3K / AKT / p300. Moreover, COX-2 inhibits the biogenesis of these miRNAs by modulating the activity of Drosha complex via physical association with DDX5. Consequently, the expression of his target gene IRS1, key in insulin signaling, increases. Besides, an inverse correlation between the expression of COX-2 and miRNAs has been demonstrated in patients with non-alcoholic steatosis.

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1. Introducción | 37 |
| 1.1. Ciclooxigenasas | 39 |
| 1.1.1. Biosíntesis de prostanoides | 39 |
| 1.1.2. Isoformas | 40 |
| 1.1.2.1. Localización | 40 |
| 1.1.2.2. Estructura génica | 41 |
| 1.1.2.3. Estructura proteica | 42 |
| 1.1.3. Vías de activación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) | 44 |
| 1.1.4. Mecanismos de acción de las prostaglandinas dependientes de COX-2 | 45 |
| 1.2. COX-2 y fisiopatología hepática | 46 |
| 1.2.1. Hígado: estructura y función | 46 |
| 1.2.2. Expresión de COX-2 en el hígado | 48 |
| 1.2.2.1. Enfermedad hepática aguda | 48 |
| 1.2.2.2. Regeneración hepática | 48 |
| 1.2.2.3. Enfermedad hepática crónica | 49 |
| 1.2.3. Papel de COX-2 en la resistencia a insulina en la enfermedad hepática grasa no alcohólica | 50 |
| 1.2.3.1. Etiopatogenia y progresión de la enfermedad hepática grasa no alcohólica | 50 |
| 1.2.3.2. Papel de COX-2 en la fisiopatología de la enfermedad hepática grasa no alcohólica | 54 |
| 1.3. microARNs (miARNs) y fisiopatología | 55 |
| 1.3.1. Biosíntesis, maduración y mecanismos de acción de los miARNs | 55 |
| 1.3.2. Relación de los miARNs y COX-2 | 59 |
| 2. Objetivos | 61 |
| 3. Material y Métodos | 65 |
| 3.1. Reactivos | 67 |
| 3.2. Generación de ratones transgénicos (Tg) para COX-2 humana (hCOX-2) en el hepatocito | 67 |
| 3.3. Establecimiento de un modelo <i>in vivo</i> de esteatosis, obesidad y resistencia a insulina inducido por una dieta rica en grasa (HFD) | 68 |
| 3.4. Pruebas de sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa <i>in vivo</i> | 69 |
| 3.5. Aislamiento, cultivo y tratamiento de hepatocitos primarios | 69 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6. Aislamiento, cultivo y tratamiento de adipocitos marrones | 70 |
| 3.7. Determinación de la función termogénica <i>in vivo</i> | 70 |
| 3.7.1. Calorimetría indirecta | 70 |
| 3.7.2. Experimento de exposición al frío | 71 |
| 3.8. Determinación de metabolitos y hormonas | 71 |
| 3.9. Cultivos celulares | 71 |
| 3.10. Generación de líneas celulares hepáticas que expresan establemente hCOX-2 | 72 |
| 3.11. Generación de plásmidos que expresan miARNs | 73 |
| 3.12. Transfecciones | 73 |
| 3.13. Ensayo del gen reportero luciferasa | 74 |
| 3.14. Modelo <i>in vitro</i> de resistencia a la insulina inducida por palmitato <i>in vitro</i> | 74 |
| 3.15. Análisis de la expresión proteica | 75 |
| 3.15.1. Preparación de extractos totales | 75 |
| 3.15.2. Determinación de proteínas | 75 |
| 3.15.3. Inmunodetección de proteínas (Western Blot) | 75 |
| 3.15.4. Inmunoprecipitación de proteínas | 77 |
| 3.16. Análisis de la expresión génica | 77 |
| 3.16.1. Aislamiento de ARN | 77 |
| 3.16.2. Aislamiento de miARN | 78 |
| 3.16.3. Determinación de los niveles de expresión de miARNs mediante array de PCR cuantitativa en tiempo real | 78 |
| 3.16.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real | 79 |
| 3.17. Pacientes | 83 |
| 3.18. Análisis estadístico | 83 |
| 4. Resultados | 85 |
| 4.1. La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protege frente a la esteatosis, obesidad, y resistencia a la insulina inducida por una dieta HFD | 87 |
| 4.1.1. Expresión y funcionalidad de hCOX-2 en el hígado de ratones Tg | 87 |
| 4.1.2. COX-2 mejora la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa en condiciones basales (dieta RCD) | 87 |
| 4.1.3. COX-2 confiere una mayor sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa en ratones tratados con una dieta HFD | 88 |

| | |
|---|------------|
| 4.1.4. COX-2 protege frente a la esteatosis hepática, adiposidad e inflamación en ratones tratados con una dieta HFD | 90 |
| 4.1.5. COX-2 modula la termogénesis en ratones tratados con una dieta HFD | 97 |
| 4.1.6. COX-2 mejora la señalización de la insulina en el hígado de ratones tratados con una dieta HFD | 100 |
| 4.2. La expresión constitutiva de COX-2 protege frente a la resistencia a la insulina mediante la regulación de un grupo de miARNs en células hepáticas | 102 |
| 4.2.1. COX-2 regula la expresión de un grupo específico de miARNs en el hepatocito | 102 |
| 4.2.2. COX-2 reduce la expresión de miR-23b, miR-146b y miR-183 a través de la acetilación de DDX5 vía PI3K-p300 en células hepáticas | 105 |
| 4.2.3. COX-2 se une a Drosha a través de DDX5 modulando su actividad enzimática en células hepáticas | 109 |
| 4.2.4. Relación entre miARNs regulados por COX-2 y la vía de señalización de la insulina | 110 |
| 4.2.5. COX-2 tiene un papel protector en un modelo <i>in vitro</i> de resistencia a la insulina | 113 |
| 4.2.6. Correlación inversa entre la expresión de COX-2 y miR-23b, miR-146b y miR-183 en ratones tratados con una dieta HFD | 116 |
| 4.2.7. Correlación inversa entre la expresión de COX-2 y miR-23b, miR-146b y miR-183 en pacientes con esteatosis no alcohólica | 117 |
| 5. Discusión | 119 |
| 6. Conclusiones | 133 |
| 7. Bibliografía | 137 |

Abreviaturas

| | |
|------------------|---|
| 15-PGDH | 15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺ |
| 3'-UTR | Región 3' no traducida |
| A | Adenosina |
| AA | Ácido araquidónico |
| aa | Aminoácido |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AKT | Proteína quinasa B (PKB) |
| ADNc | ADN complementario |
| AINE | Anti-inflamatorios no esteroideo |
| ALT | Alanina transaminasa |
| AMPK | Proteína quinasa activada por AMPc |
| AMPc | Adenosín monofosfato cíclico |
| AP-1 | Proteína activadora 1 |
| ApoE | Apolipoproteína E |
| ARE | Elementos ricos en A y U (adenina y uracilo) |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | ARN mensajero |
| AST | Aspartato transaminasa |
| BAT | Tejido adiposo marrón |
| BSA | Albúmina sérica bovina |
| C | Citosina |
| C/EBP | Proteína potenciadora de unión a CCAAT |
| Ca ⁺² | Calcio |
| ChREBP | Proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos |
| CHC | Carcinoma hepatocelular |
| CHL | Células Chang Liver |
| c-Jun | Quinasa N-terminal |
| COX | Ciclooxigenasa |
| COXIBs | Inhibidores selectivo para COX-2 |
| cPGES | PGES citosólica |
| CRE | Elemento de respuesta a AMPc |
| c-Scr | Oncogén del virus del sarcoma de Rous |
| CYP450 | Sistema citocromo P450 |
| DD | Dominio de dimerización |
| DDX5 | ARN helicasa dependiente de ATP/p68 |
| DDX17 | ARN helicasa dependiente de ATP/p72 |
| DEN | Dimetilnitrosamina |
| DFU | Inhibidor selectivo para COX-2 |
| Drosha | Endonucleasa ARNasa III |
| DM | Diabetes mellitus |
| EGF | Factor de crecimiento epitelial |
| EGFR | Receptor de EGF |
| EHGNA | Enfermedad del hígado graso no alcohólico |

| | |
|----------|--|
| ERK | Quinasas reguladoras de señales extracelulares |
| FBS | Suero fetal bovino |
| G | Guanina |
| HBx | Proteína X del VHB |
| hCOX-2 | COX-2 humana |
| HDAC | Histona deacetilasa |
| HFD | Dieta rica en grasa |
| HOX | Hidropoxidasa |
| HSCs | Células esteladas de hígado |
| IFN | Interferon |
| IKK | Proteína de la quina IκB |
| IL | Interleuquina |
| iNOS | Óxido nítrico sintasa inducible |
| IR | Receptor de insulina |
| IRS | Substrato del receptor de insulina |
| JNK/SAPK | Quinasa c-Jun N-terminal |
| Kb | Kilobase |
| KDa | KiloDalton |
| Lis | Lisina |
| LPS | Lipopolisacárido |
| MAPK | Proteína quinasa activada por mitógenos |
| MDB | Dominio de unión a membrana |
| MDR | Proteína de resistencia a múltiples fármacos |
| ME | Matriz extracelular |
| miARN | microARN |
| MRE | Elementos de respuesta a miARN |
| MN | Membrana nuclear |
| mTOR | Proteína diana de la rapamicina en mamíferos |
| NEFAs | Ácidos grasos libres no esterificados |
| NF-κB | Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B |
| NAS | Esteatosis no alcohólica |
| NASH | Esteatohepatitis no alcohólica |
| NCL | Célula Neonatal murina de hígado |
| NOS | Óxido nítrico sintasa |
| NS5A | Proteína no estructural 5 ^a |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| PG | Prostaglandina |
| PGES | Prostaglandina E sintasa |
| PGHS | Prostaglandina G/H sintasa |
| PI3K | Fosfoinositol 3-quinasa |
| PKA | Proteína quinasa A |

| | |
|------------------|--|
| PKB | Proteína quinasa B/AKT |
| PKC | Proteína quinasa C |
| PLA ₂ | Fosfolipasa A ₂ |
| PLC | Fosfolipasa C |
| PMA | Acetato de forbol miristato |
| PPAR | Receptores activados por proliferadores de peroxisomas |
| PPRE | Elemento de respuesta a PPAR |
| PTEN | Homólogo de la fosfatasa y la tensina |
| PTP1B | Proteína tirosina fosfatasa 1B |
| RBP | Proteína de unión a ARN |
| RCD | Dieta estándar |
| RE | Reticulo endoplasmático |
| RI | Resistencia a la insulina |
| ROS | Especies reactivas del oxígeno |
| SM | Síndrome metabólico |
| SP-1 | Proteína específica 1 |
| SP-2 | Proteína específica 2 |
| SP | Péptido señal |
| SRBP-1c | Proteína de unión a elementos de regulación del estero |
| T | Timina |
| TAM | Tioacetamida |
| TG | Triglicérido |
| Tg | Genotipo transgénico para hCOX-2 |
| TGF | Factor de crecimiento transformante |
| TLR | Receptor de tipo Toll |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TNF-R | Receptor de TNF |
| TXA ₂ | Tromboxanos |
| U | Uracilo |
| VHB | Virus de la hepatitis B |
| VHC | Virus de la hepatitis C |
| VLDL | Lipoproteína de muy baja densidad |
| WAT | Tejido adiposo blanco |
| Wt | Genotipo salvaje |

1. Introducción

1.1. Ciclooxygenasas

1.1.1. Biosíntesis de prostanoides

Los prostanoides son compuestos lipídicos que derivan del ácido araquidónico (AA) procedente de los glicerofosfolípidos de la membrana plasmática celular, y comprenden, entre otros, a las prostaglandinas, las prostaciclina y los tromboxanos (120, 141). El AA, liberado desde la membrana plasmática por acción de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) o de la fosfolipasa C (PLC) (34), es metabolizado a través de tres vías principales: ciclooxygenasa (COX), lipooxygenasa y citocromo P-450 monooxygenasa.

COX, también denominada prostaglandina G/H sintasa (PGHS) o prostaglandina-endoperoxido sintasa, es la enzima que cataliza el paso limitante en la biosíntesis de prostanoides, y se caracteriza por tener dos actividades enzimáticas que son secuenciales, la ciclooxygenasa (COX) y la hidroxiperoxidasa (HOX). En primer lugar, el AA es ciclado y oxigenado por la actividad COX para formar la prostaglandina G₂ (PGG₂), un metabolito intermediario inestable que debe ser rápidamente metabolizado. Por esta razón, la actividad HOX reduce (hidroxila) la PGG₂ dando lugar a la prostaglandina H₂ (PGH₂). Finalmente, la PGH₂ es utilizada como sustrato de una serie de isomerasas y oxidoreductasas específicas de tejido produciendo los diferentes productos como prostaglandinas (PGE₂, PGD₂, PGF₂), prostaciclina (PGI₂) y tromboxanos (TXA₂), que se unen a diferentes receptores y tienen diferentes acciones biológicas (Figura 1). Por ejemplo, la PGF₂ está implicada en la contracción uterina; la PGI₂ reduce la agregación plaquetaria, estimula la vasodilatación y es imprescindible para la implantación del embrión. Sin embargo, TXA₂ estimula la agregación plaquetaria, la vasoconstricción y la broncoconstricción; por su parte, la PGE₂ participa en procesos como la tonificación vascular y bronquial, la agregación plaquetaria, la fertilidad y ovulación, la inflamación y respuesta inmune, y el cáncer, entre otros (4, 5).

Existen dos tipos de liberación de las PGs, la autocrina y la paracrina que depende de la proteína 4 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (*multidrug resistance-associated protein 4*, MRP4) para la secreción de las PGs al medio extracelular (39). Una vez liberadas, las PGs se unen a receptores específicos de membrana, y se internalizan en la célula por difusión pasiva o por un transportador específico de PGs. Posteriormente, las PGs son inactivadas mediante hidroxilación por la acción enzimática de la 15-hidroxiprostaglandina deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ (*15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase*, 15-PGDH) (16, 96).

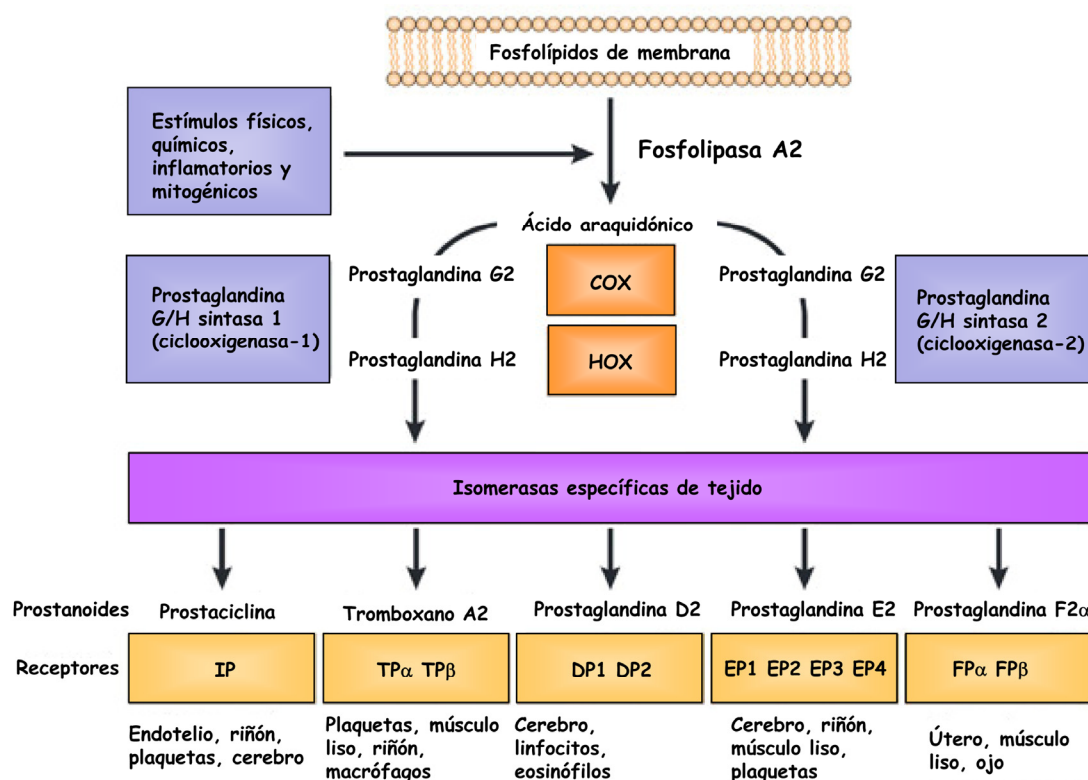


Figura 1. Vía metabólica de la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Adaptado de FitzGerald GA (39).

1.1.2. Isoformas

Se han identificado 2 isoformas de COX, codificadas por dos genes diferentes. COX-1 se expresa constitutivamente en todos los tejidos del organismos y está implicada en procesos fisiológicos (agregación plaquetaria, mantenimiento de la mucosa y regulación de la función renal); y COX-2 es de expresión inducible en respuesta a diversos estímulos y está relacionada tanto a condiciones fisiológicos (secreción de renina, función reproductiva, metabolismo óseo, protección vascular, secreción pancreática, neurotransmisión e inmunidad) como fisiopatológicos (inflamación y fiebre, cáncer, Alzheimer, etc.) (116, 129, 141). Se conoce otra isoforma, COX-3, descubierta en la corteza cerebral de canidos en 2002, y aunque aún no se conoce su función, proviene del *splicing* alternativo del gen de COX-1 (23).

1.1.2.1. Localización

Se ha demostrado que la proteína COX se localiza en la membrana externa de la bicapa lipídica más próxima al lado luminal del retículo endoplasmático (RE) y en las membrana externa e interna de la membrana nuclear (MN), estando COX-2 preferentemente localizada en la MN (24). También, COX-2 puede situarse en la membrana mitocondrial y en los

cuerpos lipídicos en células tumorales (1), incluso dentro del núcleo de células vasculares y tumorales (13,14). Por tanto, su localización está directamente relacionada con sus funciones fisiológicas (145).

1.1.2.2. Estructura génica

El gen humano de COX-1 está localizado en el cromosoma 9, y posee un tamaño de 22 Kb correspondientes a 10 intrones y 11 exones que darán lugar a transcritos de diferentes tamaños: 5,2, 4,5 y 2,8 Kb, siendo este último el más abundante. El gen de COX-2 humano se localiza en el cromosoma 1, su tamaño es de 8 Kb, está formado por 9 intrones y 10 exones, y las variantes del transcrito de ARNm son de 4,5, 4,0 y 2,6 Kb, siendo los más abundantes el de 4,5 Kb y el de 2,6 Kb. Este último está poliadenilado y carece de la región 3' no traducida (3'-UTR). Las estructuras génicas de ambas isoformas distan en el número (COX-2 carece del primer intrón) y la longitud de los intrones, y en los diferentes elementos reguladores de los promotores que les confieren determinadas cualidades funcionales (Figura 2) (24).

Los promotores del gen COX-1 humano y murino tienen tres motivos de unión a la proteína específica 1 (SP-1) implicados en la iniciación de la transcripción del gen, y un sitio de unión a la proteína activadora 1 (AP-1) que interactúa con los motivos SP-1. Además, estos promotores carecen de caja TATA. A pesar de que estas características lo convierten en un gen constitutivo por excelencia, también puede ser inducido por algunos estímulos mediante la regulación de los motivos SP-1 en determinados tipos celulares. Sin embargo, el promotor del gen humano de COX-2 contiene más elementos reguladores implicados en la transcripción: un elemento de respuesta al proliferador de peroxisomas (PPRE), dos elementos de respuesta a AMPc (CRE), un elemento de respuesta a suero (SRE), sitios SP-1, dos sitios de unión a NF- κ B, un sitio de reconocimiento a la proteína potenciadora de unión a CCAAT (C/EBP), dos sitios AP-2, una caja E y la caja TATA. Los dominios CRE, C/EBP, NF- κ B y la caja E son claves en la regulación del gen (129). Hay algunas pequeñas diferencias entre el gen de COX-2 humano y el del ratón. El gen murino de COX-2 solo tiene un sitio NF- κ B en lugar de dos, y dos sitios C/EBP en lugar de uno, con respecto al humano (72). Además, el gen de COX-2 contiene una región 3'-UTR con múltiples copias del elemento desestabilizador ATTTA, determinante para la inestabilidad del ARNm mediante regulación post-transcripcional (24). Las proteínas de unión a ARN (*RNA-binding protein*, RBP) pueden reconocer elementos enriquecidos en secuencias AU en el 3'-UTR del

ARNm (AREs) estabilizando o desestabilizando el mensajero (36). Además, existen unas regiones específicas en el 3'-UTR del ARNm de COX-2 donde se unen los microARNs (miARNs), las denominadas secuencias de respuesta a miARNs (*microRNA response element*, MRE), y regulan negativamente su expresión (154). Por otro lado, se han descrito alteraciones epigenéticas (metilación del ADN y modificaciones de histonas) relacionadas con la expresión de COX-2, principalmente en procesos relacionados con la progresión tumoral. En este sentido, existe gran controversia debido a que algunos estudios han asociado un aumento en la expresión COX-2 por alteración de la actividad de las histonas desacetilasas y a la hipometilación de su promotor en la leucemia mieloide aguda, cáncer colorrectal y gástrico. En contraposición, también se ha descrito que la expresión de COX-2 y de genes de su vía de señalización disminuye por la hipermetilación de su promotor o por la desacetilación de histonas en diferentes tipos de cáncer (mama, hepático, colorrectal, etc.) (17).

Estas características génicas hacen que la expresión de COX-2 esté regulada por un amplio espectro de mediadores biológicos implicados en inflamación, cáncer y otras patologías (55).

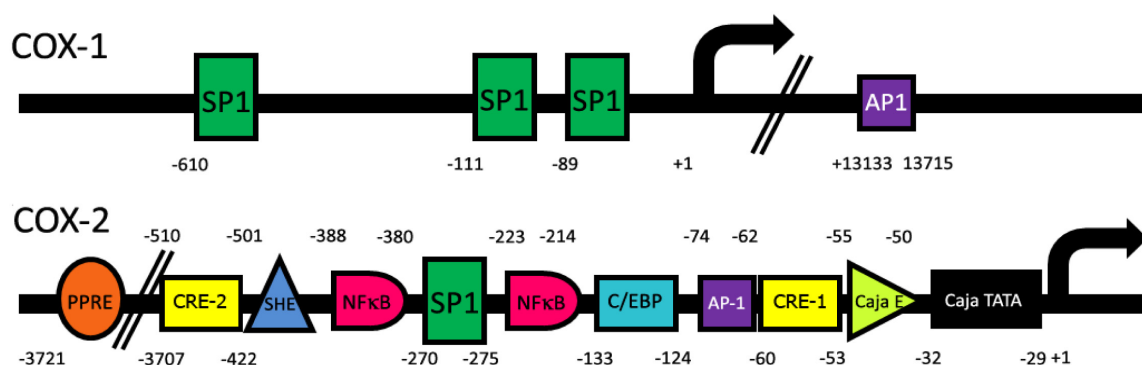


Figura 2. Elementos reguladores de los promotores de COX-1 y COX-2 humanas. Adaptado de Kang et al.(72).

1.1.2.3. Estructura proteica

COX-1 y COX-2 presentan aproximadamente un 60% de homología en sus 603 aminoácidos, pesan 72-74 KDa y tienen un tiempo de vida media que varía de 2 horas (COX-2) a 12 horas (COX-1) (95). Desde la región N-terminal hasta la C-terminal, la estructura proteica de COX-1 y COX-2 está compuesta por: un dominio regulador que tiene un péptido señal (SP), un dominio de dimerización (DD) y unión de EGF, un dominio de unión a membrana (MBD) y un dominio catalítico donde residen las actividades enzimáticas COX y HOX (Figura 3) (24).

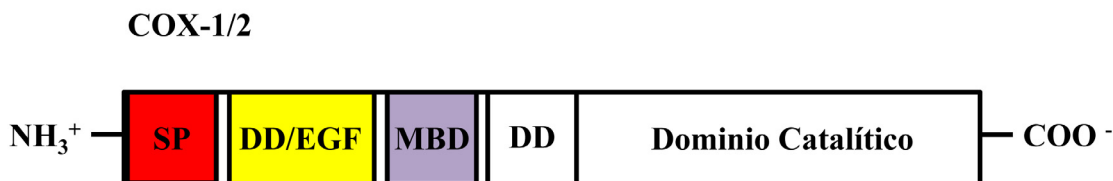


Figura 3. Dominios de la proteína COX-1 y COX-2. Adaptado de Chandrasekharan y Simmons (24).

Ambas isoformas sufren N-glicosilaciones que regulan no solamente el plegamiento de las proteínas (116), sino también su degradación (24). Una de las diferencias más importantes en su estructura proteica radica en el sitio catalítico de COX-2, que es más grande que el de COX-1, permitiendo la entrada de sustratos de mayor tamaño. El desarrollo de inhibidores selectivos para las isoformas de COX se centran en esta diferencia, y se debe a las sustitución en la isoleucina 523, histidina 513 e isoleucina 434 en COX-1 por valina 523, arginina 513 y valina 434 en COX-2 (22,23). Además COX-2 puede procesar sustratos alternativos como ésteres y derivados de amidas (endocannabinoides endógenos) (116).

En 1971, Vane y colaboradores demostraron que los tradicionales anti-inflamatorios no esteroides (AINEs), en concreto la aspirina e indometacina, inhibían la producción de PGs bloqueando la actividad enzimática de COX sin modular la actividad de HOX (9, 39). Los AINEs inhiben la actividad catalítica de COX modificando la enzima covalentemente de manera irreversible (acetilación de la Ser530 en el caso de la aspirina) o compitiendo con el sustrato por el centro activo (resto de los AINEs). Los AINEs tienen propiedades antipiréticas, analgésicas y anti-inflamatorias. Es sabido que las PGs derivadas de COX-1 juegan un papel fundamental en múltiples procesos fisiológicos, y que el uso crónico de inhibidores de esta enzima produce efectos adversos sobre la mucosa gastrointestinal. Por esta razón y dado el descubrimiento de la diferencia de tamaño del centro activo entre ambas isoformas, se desarrollaron AINEs selectivos para COX-2 (COXIBs). Los COXIBs tienen un potente efecto para reducir la formación de tumores e inducir la regresión tumoral a través de diferentes mecanismos (proliferación, supervivencia, etc.) (142), aunque la inhibición crónica de COX-2 incrementa el riesgo de padecer infarto de miocardio, aterotrombosis y disfunciones renales (4, 21). Estudios recientes han demostrado que los AINEs pueden mediar sus efectos anti-inflamatorios y anti-neoplásicos por vías alternativas a la vía de COX-2. De hecho, los efectos anti-neoplásicos de los AINEs se observan a concentraciones que son superiores a las necesarias para inhibir la síntesis de PGs y son capaces de inhibir la proliferación e incrementar la apoptosis en células que no expresan COX-2 (19).

1.1.3. Vías de activación de la ciclooxigenasa-2 (COX-2)

El mecanismo de transducción de señales que media la activación de la expresión de COX-2 varía dependiendo del estímulo y del tipo celular. Las vías de señalización más importantes son la de NF- κ B y la de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK). Ambas vías comparten efectores, incluso estímulos. La vía de señalización del NF- κ B se activa por los estímulos TNF- α/β , IL-1 α/β y lipopolisacárido (LPS) al unirse a sus respectivos receptores TNF-R, IL-1R y TLR4 así como por endotelina e hipoxia. Estos estímulos inducen la fosforilación de las proteínas I κ B por el complejo IKK y su subsecuente ubiquitinización y degradación por el proteasoma, lo que permite la translocación de p65/p50 al núcleo donde participa en la activación de genes pro-inflamatorios, incluyendo el de COX-2. En el caso de la familia de las MAPK (ERK, JNK/SAPK y p38 MAPK) se activan por factores de crecimiento (EGF, PDGF, etc.), oncogenes (v-Ser y v-Ras), citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 α/β , TNF-1 α/β , etc.), LPS, acetato de forbol miristato (PMA) y estrés oxidativo. Una vez activadas por dichos estímulos, las MAPK pueden fosforilar y activar factores de transcripción que regulan la expresión de ciertos genes como el de COX-2 (Figura 4) (72, 129).

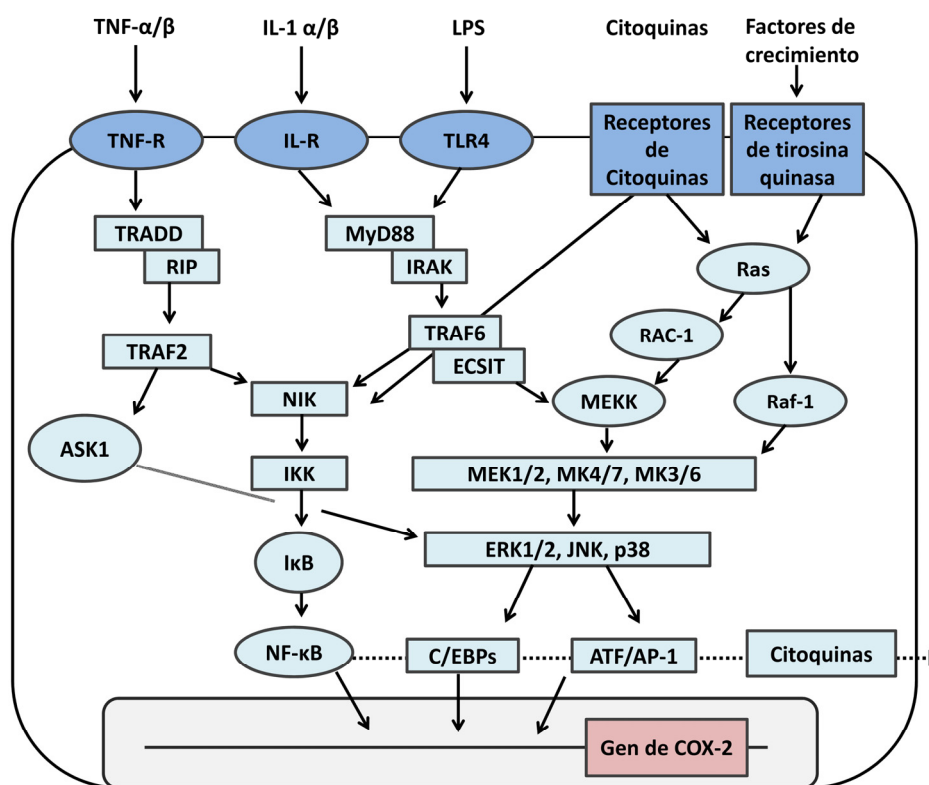


Figura 4. Vías de señalización implicadas en la inducción del gen de COX-2. Adaptado de Tanabe et al. (129).

En contraposición, los glucocorticoides, las interleuquinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-13, IL-10) y los ligandos de los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor*, PPAR) inhiben la expresión de COX-2 (129).

1.1.4. Mecanismo de acción de las prostaglandinas

La acción biológica de las PGs está mediada por dos tipos de receptores: específicos de membrana y receptores nucleares.

Los receptores de PGs específicos de membrana pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembrana acoplados a proteínas G heterotriméricas. Además, los diferentes receptores tienen subtipos de receptores; los prostanoides PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂ y TXA₂, se unen a los receptores EP (EP1, EP2, EP3, EP4), DP (DP1, DP2), FP (FP α , FP β), IP, y TP (TP α , TP β), respectivamente.

La PGE₂ es el metabolito mayoritario producido por la acción secuencial de COX-2 y la prostaglandina E sintasa (PGES). Existen diferentes subclases de PGES, la citosólica (cPGES) y las microsomales (mPGES-1 y mPGES-2). Los diversos efectos biológicos que se observan dependen de la interacción de la PGE₂ con los diferentes subtipos de receptores EP1-4. El receptor EP1 se une a proteínas G- α_q y su activación resulta en un incremento del Ca²⁺ intracelular que promueve la activación de la proteína quinasa C (*protein kinase C*, PKC). Además, la estimulación del receptor EP1 conduce a la activación del protooncogén c-Src, que induce la trans-activación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Los receptores EP2 y EP4 están acoplados a proteínas G- α_s y su activación promueve la producción de adenosina monofosfato cíclica (*cyclic adenosine monophosphate*, AMPc) estimulando la señalización mediada por fosfoinositol 3-quinasa (*phosphatidylinositide 3-kinases*, PI3K) y la activación de la proteína quinasa A (PKA). Finalmente, la unión de PGE₂ al receptor EP3 puede conducir a la activación de la proteína Rho, al incremento de los niveles de Ca²⁺ y a la disminución de los de AMPc cuando se asocia a las proteínas G- α_{12} , G- α_q , o G- α_i respectivamente (Figura 5). La presencia de distintos subtipos de receptores EPs co-expresados en la misma célula y con niveles diferentes dependiendo del tipo celular, contribuye a la complejidad de la señalización de PGE₂. Además, la PGE₂ ejerce una regulación positiva en la expresión del propio gen de COX-2 a través de AMPc. Aunque la mayoría de los receptores se localizan principalmente en la membrana plasmática, también se ha descrito una localización nuclear de EP1, EP3 y EP4 (35, 147).

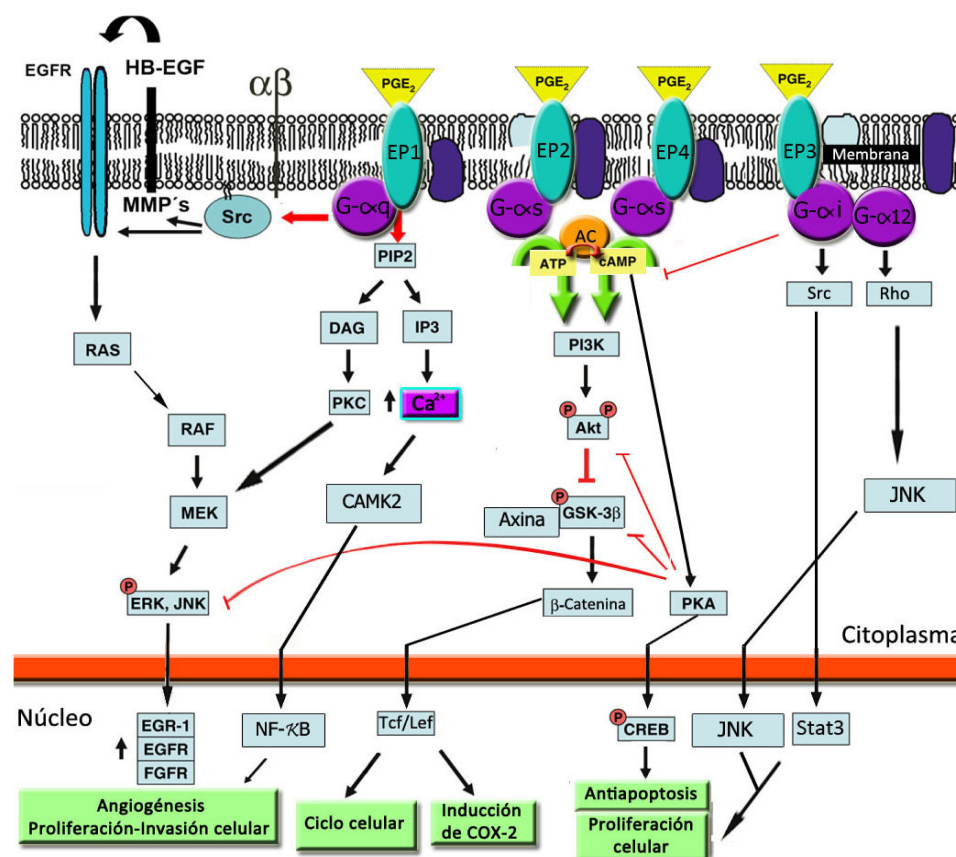


Figura 5. Vías de señalización mediadas por los receptores de PGE₂. Adaptado de Dey et al. (35).

En relación a los receptores nucleares, los derivados de la PGD₂ (PGJ₂ y 15d-PGJ₂) y de la PGE₂ (prostaglandina A₂ (PGA₂) y PGI₂) tienen afinidad por los receptores PPAR. Cuando se produce esta interacción, PPAR interfiere con determinados factores de transcripción inhibiendo la transcripción de genes implicados en inflamación (27, 121).

1.2. COX-2 y la fisiopatología hepática

1.2.1. Hígado: estructura y función

El hígado es el órgano más grande del cuerpo, sólo superado en tamaño por la piel, y se encarga principalmente del metabolismo: síntesis, almacenamiento y redistribución de nutrientes, homeostasis de la glucosa (glucogenólisis, glucogénesis, gluconeogénesis, etc.), lípidos (colesterol, triglicéridos, etc.) y síntesis de vitaminas y de proteínas (albúmina, lipoproteínas, factores de coagulación, etc.). También, el hígado cumple otras funciones como eliminar productos biológicos tóxicos y agentes xenobióticos por conversión metabólica y excreción biliar.

Histológicamente, el hígado está compuesto por lóbulos que son las unidades funcionales. Los lóbulos hepáticos tienen estructuras hexagonales formadas por hileras de hepatocitos en

monocapa (a veces en bicapa) en cuyo centro se encuentra una vena central, que desemboca en las venas hepáticas y estas a su vez en la vena cava inferior. Entre hilera e hilera, se encuentran los sinusoides hepáticos y el espacio que queda entre ellos se denomina espacio de Disse. Los vértices del hexágono corresponden a las triadas portales que están integradas por una rama de la arteria hepática (arteriola), una rama de la vena porta (vénula) y un conducto biliar que conduce la bilis hacia los conductos biliares mayores. El hígado tiene un sistema circulatorio portal: la sangre entra por dos vías, la arteria hepática que transporta sangre oxigenada y la vena porta que conduce sangre desoxigenada rica en nutrientes del aparato digestivo, el bazo, el páncreas y la vesícula biliar. Dentro del hígado, ambos tipos de sangre se mezclan y después de ser filtrada por los sinusoides hepáticos, abandona el hígado a través de la vena hepática (Figura 6).

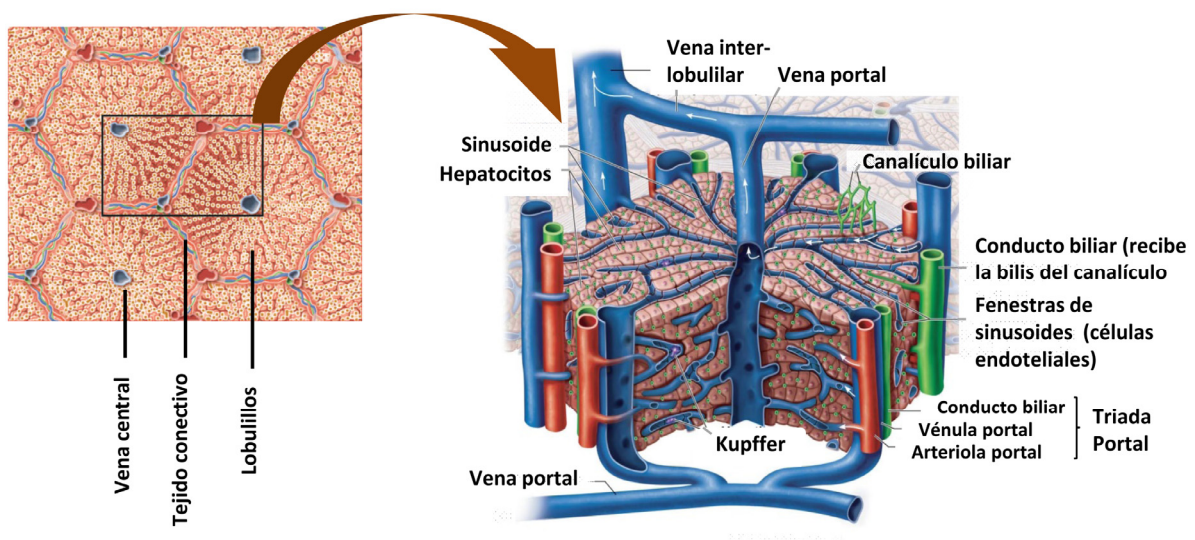


Figura 6. Estructura del lóbulo hepático. Adaptado de Pearson Education 2011.

En relación a los tipos celulares que integran el hígado, el hepatocito que desempeña la mayoría de las funciones descritas en el hígado, constituye el 80% del total de las células hepáticas. Su función es dependiente de si su localización es peri-portal o peri-central en el lóbulo hepático. El otro 20% de células hepáticas está constituido por células no parenquimáticas que incluyen a células de Kupffer, células endoteliales, células epiteliales biliares (colangiocitos), linfocitos y células hepáticas estrelladas o de Ito (*hepatic stellate cells*, HSCs). Las células de Kupffer son macrófagos especializados que se encuentran circulando por los sinusoides hepáticos, y se encargan de fagocitar y eliminar cualquier partícula extraña que llegue al hígado. Las células endoteliales constituyen la mayor parte de las células de la pared de los sinusoides. Los colangiocitos conforman el canal de Hering en el cual confluye la bilis. Y las células HSCs que son de origen mesenquimal, se localizan

en el espacio de Disse y desempeñan principalmente funciones de almacenamiento de vitamina A y producción de matriz extracelular (ME) del tejido conectivo (colágeno I, III y IV) (90, 161).

1.2.2. Expresión de COX-2 en el hígado

La expresión de COX-2 no es inducible en los hepatocitos adultos, independientemente de los factores pro-inflamatorios utilizados. Sin embargo, COX-2 sí se expresa en el hepatocito fetal (con un fenotipo menos diferenciado que el adulto), en algunas líneas celulares hepáticas y en las células no parenquimáticas (92). Se ha demostrado que la expresión diferencial del factor de transcripción C/EBP α en el hepatocito fetal y adulto tiene un papel fundamental en la inducción de COX-2. De hecho, en los hepatocitos adultos, se encuentran altos niveles de C/EBP α , que inhiben el gen de COX-2 (11). La expresión de COX-2 en el hepatocito se restringe a procesos de des-diferenciación y proliferación (regeneración) como respuesta a una hepatectomía parcial, al daño hepático agudo y a enfermedades hepáticas crónicas (91, 93).

1.2.2.1 Enfermedad hepática aguda

Se ha estudiado el papel que desempeña COX-2 en modelos de daño hepático agudo. Los animales que expresan COX-2 constitutivamente en el hepatocito están protegidos frente a la lesión hepática generada por Jo2 (ligando Fas), LPS/D-galactosamina y Concanavalina-A. Este efecto protector por parte de COX-2 es debido a una estimulación temprana de la proliferación celular y a una disminución de la apoptosis y necrosis. En estos mismos modelos de daño hepático, se demostró que los inhibidores COXIBs revierten la protección (15, 82, 94).

1.2.2.2. Regeneración hepática

En el contexto de la regeneración hepática, COX-2 se induce en modelos animales después de una hepatectomía parcial, favoreciendo la recuperación de la masa hepática provocada por un incremento en la proliferación celular (14, 94). En este sentido, Zhang y colaboradores demostraron que la disrupción o la inhibición farmacológica de la 15-PGDH promovió la regeneración tisular por incremento de los niveles de PGE₂ después de una hepatectomía parcial (160). Además, ratones tratados con COXIBs mostraron un retraso en el inicio de la regeneración hepática (14). En otros modelos de regeneración después del

daño hepático agudo, como el de la tioacetamida (TAM), se ha demostrado una disminución significativa en los niveles de C/EBP α y C/EBP β coincidiendo con la inducción de COX-2 (37). De hecho, la disrupción simultánea de COX-2 junto con otros genes relacionados en la regeneración hepática como la óxido nítrico sintasa-2 (iNOS) produjeron una inhibición en la regeneración del hígado (60, 82, 158).

1.2.2.3. Enfermedad hepática crónica

La inflamación crónica del hígado conduce a fibrosis hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC). Desde el punto de vista fisiopatológico, la fibrosis hepática representa el proceso de cicatrización que se produce en respuesta a un daño hepático crónico o repetido, lo que conduce a un aumento de la ME secretada por las células HSCs (41). En este sentido, existe una gran controversia en cuanto al papel de las prostaglandinas derivadas de COX-2 en la fibrosis hepática (65, 66, 108, 144, 155).

Se ha descrito que COX-2 se induce en el hepatocito en otras enfermedades crónicas como la cirrosis hepática (150). También se ha reportado que el celecoxib tiene un efecto beneficioso en la cirrosis hepática y en la hipertensión portal generada por este tipo de patología (43, 144).

Existe una evidente asociación entre la expresión de COX-2 y el cáncer (141). La sobreexpresión de COX-2 está asociada a pacientes con CHC bien diferenciado y en hígados de pacientes sanos, sugiriendo que COX-2 podría estar implicada en estadios tempranos de la hepatocarcinogénesis (20). Sin embargo, las PGs dependientes de COX-2 no parecen mediar en la hepatocarcinogénesis ni en modelos químicos en animales tratados con dietilnitrosamina ni en un modelo genético de ratones doble (COX-2/c-myc) y triple transgénicos (COX-2/c-myc/TGF) (86, 87).

Como consecuencia de los procesos de inflamación crónicos como el generado por la infección del virus de la Hepatitis B (VHB) y C (VHC), se induce la expresión de COX-2 en el hígado. Dicha expresión está mediada por diversas proteínas que activan su promotor; la proteína X del VHB (HBx) asociada a factores de transcripción en el caso del VHB, y la proteína no estructural 5A (NS5A) así como la proteína del núcleo en caso del VHC (104, 156).

1.2.3. Papel de COX-2 en la resistencia a insulina en la enfermedad hepática grasa no alcohólica

1.2.3.1. Etiopatogenia y progresión de la enfermedad hepática grasa no alcohólica

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA, *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) es un término clínico para definir la patología que se desarrolla en ausencia de abuso de alcohol y que incluye un espectro de alteraciones que van desde la simple acumulación de grasa en el hígado, también llamada esteatosis no alcohólica (*non-alcoholic steatosis*, NAS), a la esteatohepatitis no alcohólica (*non-alcoholic steatohepatitis*, NASH), y a la fibrosis, que en última instancia puede conducir a cirrosis y a CHC (Figura 7) (29).

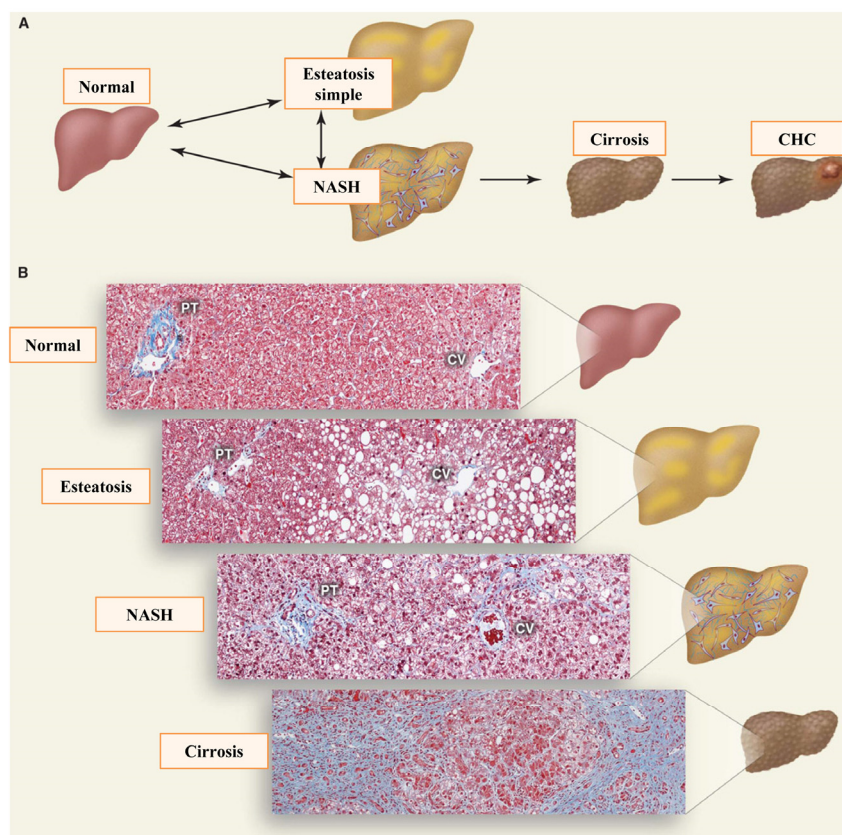


Figura 7. Espectro de la EHGNA. A) Representación esquemática de la progresión de la EHGNA desde un hígado sano (normal) a un CHC. B) Fotografías de cortes histológicos teñidos con la tinción Tricrómica de Masson que ilustra las fibras de colágeno (azul) en la progresión de la EHGNA. PT: Triada portal; CV: vena central. Adaptado de Cohen et al.(29).

La EHGNA es un importante problema de salud que afecta a un tercio de los adultos y a un creciente número de niños en los países desarrollados. Alrededor del 90% de los pacientes con EHGNA tiene al menos una característica del síndrome metabólico (SM) y alrededor del 33% tienen el diagnóstico completo. Por esta razón, la EHGNA está considerada como la manifestación hepática del SM, que engloba características como la obesidad, la diabetes mellitus (DM), la resistencia a la insulina (RI), la dislipidemia y la hipertensión. Su

patogenia sigue siendo poco conocida y las opciones terapéuticas están limitadas a la modificación del estilo de vida (dieta y ejercicio) (56).

En relación a la patogénesis, existen numerosas causas que pueden desencadenar la EHGNA: alteraciones en el metabolismo de lípidos y glucosa, mutaciones genéticas, cambios hormonales, alteraciones en la actividad física y en la dieta, inflamación, estrés oxidativo, entre otras. El primer hecho indispensable para el desarrollo de la EHGNA es la esteatosis hepática (NAS) que se produce en etapas tempranas, y que se caracteriza por la deposición de triglicéridos (TGs) como pequeñas gotas de lípidos en citoplasma del más del 5% de los hepatocitos. La esteatosis hepática se produce cuando la tasa de síntesis de ácidos grasos (AGs) por los hepatocitos supera a la tasa de degradación mediante oxidación y exportación mediante VLDL (Figura 8). Esta etapa es reversible, pero si se sigue acumulando lípidos puede progresar a inflamación hepática crónica, RI, y a NASH (3).

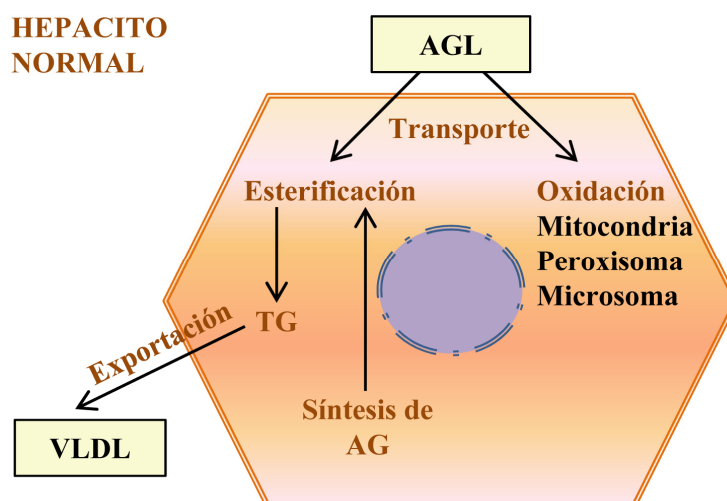


Figura 8. Metabolismo y transporte de ácidos grasos libres (AGL) en el hepatocito. Adaptado de Angulo P. (3).

La RI es un evento clave en la fisiopatología de enfermedades relacionadas con la obesidad como la DM y la EHGNA. El mecanismo molecular subyacente a la RI implica una disminución de los niveles y de la actividad del receptor de insulina (*insulin receptor*, IR), de los substratos del receptor de insulina 1/2 (*insulin receptor substrate* 1/2, IRS1/2), de la 3-fosfatidilinositol-3-quinasa (*phosphatidylinositol-3-kinase*, PI3K), así como alteraciones en la translocación de la glucosa (transportador) y la actividad de enzimas intracelulares (119). Aunque existe un nexo entre la RI y la EHGNA, aún no se ha consensuado si la esteatosis hepática es una consecuencia o una causa de la RI (8). Existe evidencia de que la RI produce esteatosis hepática en humanos con mutaciones en AKT2 (122), sin embargo otros autores no detectaron RI en pacientes con esteatosis hepática, sugiriendo que la acumulación de

lípidos precede a la RI (46). Se ha postulado que la causa principal de la RI en tejidos diana (hígado, tejido adiposo y músculo) que conduce a un efecto desensibilizante, es el incremento de los AGL circulantes en sangre (56). La RI conduce a la acumulación de lípidos por diferentes vías. Una de ellas, implica un aumento en la glucemia y de insulinemia que se traduce en un incremento de los niveles de la proteína de unión a elementos de respuesta a carbohidratos (*carbohydrate response element binding protein*, ChREBP) y en la proteína de unión a elementos de regulación del esteroide (*Sterol regulatory element-binding protein 1*, SRBP-1c), respectivamente, lo que conlleva a la síntesis *de novo* de AGs. Además, la hiperinsulinemia proveniente de la RI, incrementa la síntesis de AGs como consecuencia de un aumento de la glucólisis, y favorece la acumulación de TGs en el interior de los hepatocitos dada la disminución en la producción hepática de la apolipoproteína B-100 (VLDL). Por otra parte, tanto los AGs excedentes provenientes de la lipólisis producida en los tejidos periféricos (adiposo principalmente por acción de lipasas) consecuencia de la RI, y los provenientes de la dieta, son transportados al interior del hepatocito. El aumento de ácidos grasos libres en el citoplasma produce una sobrecarga en la β -oxidación mitocondrial con la consecuente acumulación de estos o en forma de triglicéridos en los hepatocitos. Además, el excedente de ácidos grasos puede ser metabolizado por las citocromos lipooxigenasas microsomales P-450 2E1 y 4A, produciendo radicales libres capaces de inducir peroxidación lipídica en la membrana de los hepatocitos (Figura 9) (3, 5).

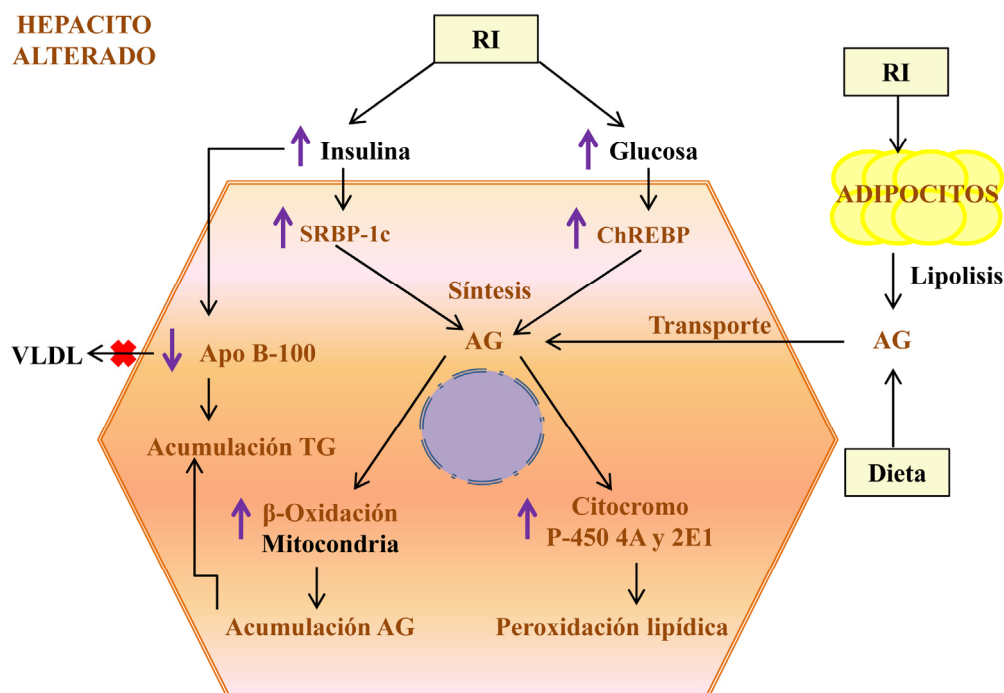


Figura 9. Mecanismos implicados de la esteatosis hepática en la EHGNA. Adaptado de Angulo P., y Asaoka et al. (3, 5).

Durante la progresión de la enfermedad, hay varios procesos que pueden desencadenar NASH: estrés oxidativo, endotoxinas de la microbiota, inflamación por citoquinas, desbalance de adipoquinas, estrés del retículo endoplásmico y disfunción mitocondrial. NASH se distingue de la NAS por la presencia de lesiones en hepatocitos (que desemboca en pérdida de la estructura característica adquiriendo una estructura globular, también llamada *ballooning*), apoptosis/necrosis, infiltración inflamatoria y/o deposición de colágeno (fibrosis). La inflamación en la EHGNA es el resultado de una estrecha relación entre el parénquima y las células no parenquimatosas a través de mediadores solubles bioactivos y la infiltración de macrófagos, linfocitos y neutrófilos en el tejido hepático (21). Los macrófagos residentes en hígado, también denominado células de Kupffer, y las HSCs contribuyen a la expresión de citoquinas durante la NASH. Una creciente evidencia apoya un papel central de las citoquinas pro-inflamatorias, particularmente el factor de necrosis tumoral alfa (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- α) y la interleucina 6 (IL-6) en el desarrollo de la EHGNA (6).

Las células del hígado también son el blanco de compuestos biológicos generados por el tejido adiposo en respuesta a la acumulación de lípidos y RI, denominados adipoquinas (148). Entre estas, las más estudiadas son la adiponectina, la leptina y la resistina. Se ha reportado en modelos animales y en pacientes obesos con EHGNA bajos niveles de expresión de adiponectina. Es conocido que la adiponectina reduce la RI, los niveles de ácidos grasos y triglicéridos en músculo e hígado, además de incrementar la β -oxidación y el gasto energético. Estos efectos beneficiosos se deben en parte, a la reducción de los niveles de TNF- α , atenuando su efecto inhibitorio sobre la vía de la insulina por reducir la fosforilación en serina de IRS1. Además, la adiponectina suprime la gluconeogénesis. En relación a la inflamación, la adiponectina además de bloquear la activación de citoquinas pro-inflamatorias como el TNF- α e IL-6, reduce el número de macrófagos e incrementa los niveles de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10, teniendo así un efecto beneficioso sobre la progresión de la EHGNA (6, 119). La leptina tiene un papel dual en la EHGNA, por un lado protege frente a la esteatosis hepática e RI en estadios tempranos, y por otro actúa como un factor inflamatorio y fibrogénico cuando la enfermedad persiste o progresa. Los hepatocitos expresan el receptor de leptina y ejerce una acción inhibitoria de la lipogénesis *de novo* y estimula la β -oxidación, reduciendo así los TGs hepáticos, la lipotoxicidad y la lipoapoptosis. Además, suprime la glucogenólisis hepática, reduciendo los niveles de glucosa y la glucotoxicidad derivada. De hecho, ratones resistentes a la leptina y deficientes para ésta como db/db y ob/ob, respectivamente, desarrollan RI. Por otro lado, la leptina

estimula a las células de Kupffer y HSCs, contribuyendo a la inflamación, estrés oxidativo y fibrosis (112). Otra adipocina, la resistina, se descubrió recientemente y parece favorecer la RI. De hecho, la administración con anticuerpos contra resistina mejora la glucemia y la sensibilidad a la insulina en ratones alimentados con una dieta obesogénica (67).

Finalmente, el conjunto de eventos fisiopatológicos como la esteatosis, la RI, la inflamación, la muerte celular y estrés oxidativo, pueden conducir a la progresión de NASH hacia fibrosis, cirrosis, y en última instancia desarrollar CHC.

1.2.3.2. Papel de COX-2 en la fisiopatología de la enfermedad hepática grasa no alcohólica

Existe gran controversia en cuanto al papel que desempeña COX-2 en la EGHNA. Existen evidencias de que las PGs dependientes de COX-2 pueden favorecer la acumulación de grasa en los hepatocitos, y por lo tanto, el desarrollo de esteatosis y RI. Hsieh y colaboradores demostraron que la sensibilidad a la insulina en tejido muscular y adiposo mejora en ratas alimentadas con dieta rica en grasa (High fat diet, HFD) o fructosa tratadas con inhibidores de COX-2 (62, 63, 133). Además, otros estudios con animales alimentados con una dieta HFD, mostraron que la expresión de COX-2 es inducida por la dieta, y que el tratamiento con celecoxib reducía la esteatosis hepática así como el estado inflamatorio (26). También, Henkel y colaboradores demostraron que la PGE₂ estimula la acumulación de grasa e interrumpe la señalización intracelular de la insulina en hepatocitos de rata a través de la fosforilación de la serina del IRS vía EP3-ERK (58). Sin embargo, Coll y colaboradores observaron que el tratamiento con inhibidores de COX-2 exacerbó la inflamación y la RI inducida por palmitato en músculo esquelético (30). En este sentido, resultados previos de nuestro laboratorio, en los cuales se utilizó un modelo de ratón transgénico para COX-2 humana (Tg), indicaron un papel protector de la COX-2 a la lesión hepática derivada de la hiperglucemia inducida por estreptozotocina en ratones y en las células hepáticas transgénicas a través de una disminución en las proteínas pro-apoptóticas y un aumento de las vías de supervivencia PI3K / Akt / AMPK (40).

Por otro lado, se ha publicado recientemente que COX-2 está implicado en la regulación del proceso termogénico. La expresión de COX-2 aumenta en tejido adiposo en ratones expuesto al frío a través de la noradrenalina, y se correlacionan con la expresión de marcadores de diferenciación del tejido adiposo marrón (*brown adipose tissue*, BAT) tales como Ucp1, Dio2, Prdm16, entre otros. Además, se demostró que la inducción de la expresión COX-2 en

el tejido adiposo blanco (*white adipose tissue*, WAT) protege frente a la obesidad inducida por una dieta HFD a través de un aumento en el gasto energético (140).

1.3. microARNs (miARNs) y fisiopatología

1.3.1. Biosíntesis, maduración y mecanismos de acción de los miARNs

Los miARNs son ARNs cortos no codificantes, de cadena sencilla, que influyen en la regulación post-transcripcional de genes, afectando a la estabilidad del ARNm y/o reprimiendo su traducción. Los miARNs constituyen una de las familias de genes más abundante, y están distribuidos y conservados en animales, plantas, protistas, virus, etc. Además, los miARNs controlan una multitud de procesos tanto fisiológicos como patológicos: desarrollo, proliferación, diferenciación, supervivencia, metabolismo, estabilidad genómica, inflamación, invasión y angiogénesis (47, 123).

El primer miARN, *lin-4*, fue identificado como 2 transcritos del gen *lin-4*, clave en el desarrollo de *Caenorhabditis elegans* en 1993, aunque su función regulatoria no se determinó hasta 2001. A partir del descubrimiento de *lin-4*, se han identificado hasta la fecha más de 2.000 miARNs; se sabe que un miARN tiene como diana de cientos a miles de ARNm, y que un mismo ARNm puede ser estar regulado por diferentes miARNs, por lo que la biogénesis de los miARNs tiene un papel fundamental en la modulación de sus genes diana en los distintos tipos celulares (53, 83).

Los genes de los miARNs pueden estar localizados en diferentes regiones del genoma, y en base a esto son clasificados en: miARNs exónicos ó intrónicos localizados en transcritos codificantes ó no codificantes. Adicionalmente, existen algunos miARNs ubicados en unidades transcripcionales que son expresados en grupo (clúster) (81, 146).

Los miARNs maduros tienen una longitud de 20-25 nucleótidos, un grupo fosfato en extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Son generados a partir de un transcrito primario largo en un proceso secuencial de dos reacciones, las cuales son guiadas por Drosha y Dicer, respectivamente. Esta es llamada vía canónica, y es predominante en la mayoría de mamíferos (123). En el núcleo, los miARNs son transcritos por la ARN polimerasa II (predominantemente) o por la ARN polimerasa III, produciendo una molécula larga con una estructura en forma de horquilla (*stem-loop*) compuesta por un tallo y un bucle, denominada miARN primarios (pri-miARN). A continuación, el tallo es cortado por la endonucleasa ARNasa III conocida como Drosha, que junto con el cofactor DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region 8*, también llamado Pasha en invertebrados), forman el complejo

microprocesador. DGCR8 interactúa con los pri-microARNs a través de los segmentos de cadena simple y del tallo, permitiendo que Drosha los elimine. El producto resultante es una molécula de 60-70 nucleótidos denominada miARN precursor (pre-miARN), que se caracteriza por poseer dos nucleótidos libres en su extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5'. Una vía alternativa, independiente de Drosha, es la generación de pre-miARNs mediante el *splicing* alternativo de genes de miARNs localizados entre exones de genes codificantes (mirtrones) (77). El pre-miARN es exportado del núcleo al citoplasma gracias a la exportina-5 dependiente de actividad Ran-GTP. Ya en el citosol, la GTP es hidrolizada a GDP y el pre-miARN es liberado del complejo exportador al desamblarse, y es reconocido por el complejo endonucleasa formado por la ARNasa III (Dicer) y la proteína de unión a ARN en respuesta a trans-activación (*TAR RNA-binding protein*, TRBP). Dicer rompe y elimina el bucle de los pre-miARNs, generando un miARN duplexo de aproximadamente 22 nucleótidos, que contiene una cadena madura de miARN y su cadena complementaria. Posteriormente, este complejo se ensambla con la proteína Argonauta 2 (*Argonaute 2*, Ago2) gracias a la unión con TRBP, para formar el complejo silenciador inducido por miARNs (*miRNA-induced silencing complex* miRISC), el cual selecciona una de las cadenas que será responsable de dirigir el silenciamiento (madura), y la otra será degradada (miARN*) (54). Dependiendo de la complementariedad total o parcial del miARN maduro a su gen diana en las regiones MRE del 3'UTR, el complejo miRISC puede conducir a la degradación del ARNm o a la inhibición de la traducción, respectivamente. En el primer mecanismo, la enzima que degrada el ARNm diana es Ago2, mientras que en el otro mecanismo, el complejo miRISC se incorpora en los cuerpos P (GW182 como proteína principal) inhibiendo la traducción de los ARNm diana por dos mecanismos: eliminación de la poliadenilación del extremo 3' del ARNm, fomentando la actividad de las desadenilasas (CCR4 y CAF1), seguidas por la degradación del ARNm (PABP); ó bien bloqueando la iniciación o elongación de la traducción, inhibiendo el factor eucariótico de la elongación o causando la parada del ribosoma (Figura 10) (77).

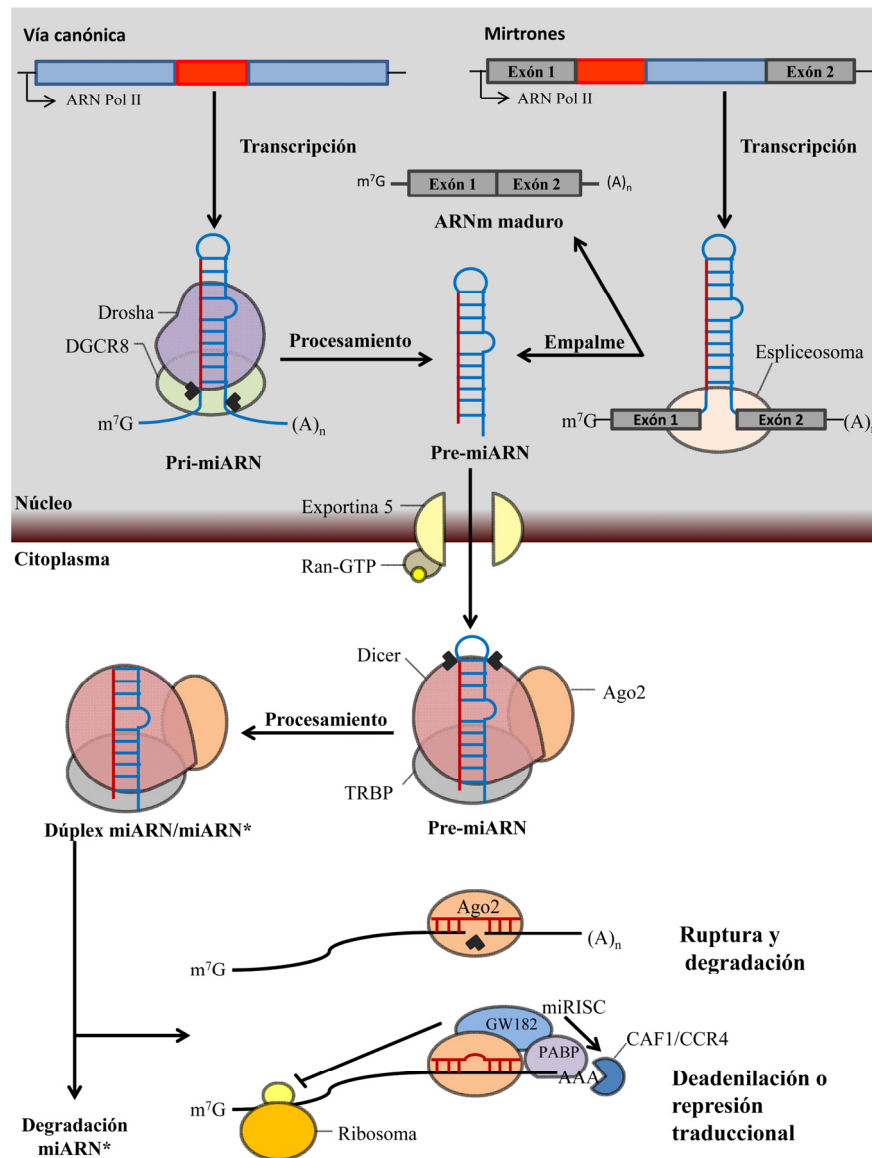


Figura 10. Biogénesis, maduración y función biológica de los miARNs. Adaptado de Krol et al. (77).

Los miARNs pueden ser regulados a nivel transcripcional o postranscripcional en las diferentes etapas del procesamiento, proceso clave en la estabilidad y renovación de los miARNs (18).

Entre los puntos de control transcripcional, se encuentran factores de transcripción que regulan positivamente (p53, MYC, MYOD1) o negativamente (MYC, ZEB1/2) a diferentes clústeres de miARNs; aunque los miARNs también pueden estar modulados individualmente (54). La regulación epigenética (metilación de ADN y las modificaciones de histonas) también pueden contribuir a la modulación de los miARNs. Además, la expresión de los miARN localizados en los mirtrones es dependiente, a su vez, de los propios factores de transcripción, islas CpG, TATAbox, etc., de los genes codificantes para proteína (18).

La regulación post-transcripcional es compleja y está implicada en el procesamiento llevado a cabo por el complejo Drosha/DGCR8, en la exportación de los pri-miARN, e incluso en el procesamiento por el complejo miRISC. En lo que respecta al procesamiento, numerosas moléculas modulan positivamente la expresión de los miARNs por unión al complejo Drosha/DGCR8, por ejemplo las ARN helicasas DDX5 y DDX17 (*RNA helicase p68/72* o *DEAD box protein 5/17*, DDX5/17). Otras como SMAD vía TGF- β no solamente incrementa la maduración por unión a los pri-miARN al complejo, incluso puede hacerlo por unión a DDX5 (como miR-21, miR-199a) (33, 54). También, la activación de p53 causada por daño en el ADN, media a través de DDX5 en el procesamiento de miARN implicados en la supresión de la proliferación. En este sentido, el supresor tumoral de cáncer de mama (*breast cancer 1*, BRCA1) puede unirse a DDX5, Smad3 y p53, entre otros, favoreciendo la maduración de los miARNs (123). Otros moduladores positivos son las RBPs, como la proteína reguladora del empalme tipo KH (*KH-type splicing regulatory protein*, KSRP) o la ribonucleoproteína A1 heterogénea nuclear (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1*, HNRNPA-1). En lo que respecta a la regulación negativa, DDX5/17 también pueden actuar modular el procesamiento de los miARNs, por unión y secuestro de la proteína YAP1 (*Yes-associated protein 1*) (83). El complejo NF90/NF45 también se puede unir a pri-let-7a, pri-miR-15a, pri-miR-16-1, miR-21 y miR-30a reduciendo la accesibilidad de DGCR8 al complejo (118). También, LIN28 se une a pri-let-7a y las adenosinas desaminasa de ARN (*adenosine deaminase acting on RNA*, ADAR) modifican el miR-142 inhibiendo el procesamiento por interferencia con el Drosha/DGCR8 (54).

A nivel de exportación, se han encontrado alteraciones en la exportina 5 que afectan a la maduración de los miARNs. De hecho, se han identificado mutaciones en esta proteína que generalmente afectan a la acumulación de los pri-miARN en el núcleo en distintos tipos de cáncer (83).

En el citosol, la regulación está preferentemente supeditada al procesamiento por Dicer, a la regulación de las proteínas TRBP o Ago y a la estabilidad de los miARNs. Destacar que KSRP controla positivamente la maduración a través del complejo Dicer, sin embargo LIN28 permite que la poli-uridina terminal polimerasa TUT4 actúe sobre los pre-miARN y sean degradados. Además, la fosforilación en las proteínas TRBP por ERK conducen a la estabilización y una mejora del procesamiento (fosforilación). En referencia a Ago, es susceptible a fosforilación por EGFR, inhibiendo la maduración de los miARNs por el

complejo Dicer. También, Ago puede sufrir modificaciones post-traduccionales que favorecen o inhiben la maduración de los miARNs (54).

1.3.2. Relación de los miARNs y COX-2

Los miARNs son potenciales reguladores de diversos procesos fisiológicos como proliferación, diferenciación y desarrollo de órganos, control de la energía y metabolismo de los lípidos y de la glucosa. Estudios recientes han encontrado alteraciones en el patrón de expresión de miARNs en el hígado asociado con procesos fisiopatológicos como daño hepático, hepatitis viral, RI, EHGA y CHC (18, 38).

Existe un nexo entre COX-2 y la expresión de miARNs. La región 3'-UTR de COX-2 contiene múltiples copias de elementos ricos en AU (secuencias ARE) y elementos de respuesta a miARNs (MRE), que cuando se unen específicamente RBPs y miARNs, respectivamente, afectan a la estabilidad de COX-2 y a la eficiencia en la traducción (55). En este sentido, Dey y colaboradores investigaron la regulación de miARNs durante la implantación embrionaria, y concluyeron que miR-101a y miR-199a comparten perfiles de expresión temporal y espacial similares al de COX-2 en el útero del ratón durante la implantación. También demostró que miR101a y miR199a interaccionan con la región 3'-UTR de COX-2 *in vitro*, reprimiendo su traducción (22). Asimismo, otro trabajo descubrió que miR-101a inhibe la proliferación celular a través de la regulación de la expresión de COX-2 en células epiteliales, siendo un evento clave durante el desarrollo de la glándula mamaria (130). En relación a los procesos patológicos, se ha demostrado que la represión de miR-101 está implicada en la sobre-expresión de COX-2 en células humanas de cáncer de colon (127). También, el miR-26b regula la expresión de COX-2 en el carcinoma de células epiteliales de la lengua (13) y la unión de miR-16 a las regiones ARE del ARNm de COX-2 podría promover su degradación (69). De hecho, se ha publicado que HuR está sobreexpresada en células de cáncer colorectal, donde puede actuar impidiendo la degradación del ARNm de COX-2 mediada por miR-16 (154). En este sentido, nuestros resultados previos revelan que miR-16 reduce la expresión de COX-2 en células humanas de hepatocarcinoma mediante dos mecanismos: por unión directa a la región MRE en el 3'-UTR de COX-2 y por reducción de los niveles de HuR (2).

Por tanto, si bien ya se han estudiado los mecanismos por los cuales los miARNs regulan la expresión de COX-2, aún no se conocen los efectos de la modulación de los miARNs por parte de COX-2 y sus posibles consecuencias funcionales en la patología hepática.

2. Objetivos

Los objetivos que se plantean en esta tesis son los siguientes:

- **Evaluar la participación de COX-2 durante el proceso de daño hepático, resistencia a insulina y alteración de la homeostasis metabólica y energética inducida por una dieta rica en grasa. Y específicamente, analizar si la expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito es suficiente para evitar las alteraciones inducidas por una dieta rica en grasa sobre las vías Akt y/o AMPK.**
- **Estudiar el papel de COX-2 en la regulación de los miARNs en el hígado y examinar las consecuencias fisiopatológicas relacionadas con la resistencia a la insulina. Además, determinar el mecanismo por el cual COX-2 modularía la expresión de los miARNs.**

3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos

Los anticuerpos fueron adquiridos en Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, EEUU), Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), Cell Signaling Technology (Boston, MA, EEUU), Abcam (Cambridge, Reino Unido) y Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, EEUU). PGE₂ fue suministrada por Cayman Chemical. La insulina humana inyectable (Atrapid) fue adquirida en Novo Nordisk Pharma S.A (Madrid, España). Los inhibidores farmacológicos C646 y DFU (5,5-dimetil-3(3-fluorofenil)-4-(4-metilsulfonil) fenil-2(5H)-furanona) fueron obtenidos de Millipore (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) y Merck (Kenilworth, NJ, EEUU), respectivamente. Otros reactivos fueron provistos por Merck, Roche Diagnostics (Mannheim, Alemania) o Sigma. Los reactivos empleados en la electroforesis y el Western Blot fueron proporcionados por Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU). Las placas y los medios de cultivo celular fueron suministrados por Falcon (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, EEUU) y Gibco (InvitrogenTM, Grand Island, NY, EEUU), respectivamente.

3.2. Generación de ratones transgénicos (Tg) para COX-2 humana (hCOX-2) en el hepatocito

En esta tesis se ha trabajado con un modelo de ratón transgénico que sobre-expresa la COX-2 humana (hCOX-2) en el hepatocito (Tg). Para generar dichos ratones, se utilizó un vector lentiviral pLIV-LE6 que contiene el promotor del gen constitutivo ApoE humano y una región específica (*hepatic control region*, HCR) que regula la expresión en el hepatocito (cedido de Dr. John Taylor, Gladstone Institute, San Francisco, CA) (15). La región HCR está ausente en otros tipos celulares, como por ejemplo los macrófagos que cuentan con sus propias regiones específicas denominadas ME.2 y ME.1 (137), asegurándonos de que la expresión es exclusiva en los hepatocitos.

Brevemente, el plásmido transgénico (LIVhCOX-2) se generó por clonación de un fragmento del ADNc que codifica el marco de lectura abierto hCOX-2 en los sitios de restricción de las enzimas KpnI-XhoI del vector. El fragmento NotI-SpeI de 6,84 kb del LIVhCOX-2 (Fig. 1A) fue aislado e inyectado en pronúcleos de células embrionarias de ratón obtenidas por apareamiento de C57BL/6J X DBA (Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Posteriormente, los embriones de dos células se transfirieron a los oviductos de hembra adoptiva pseudopreñada de raton CD1. Después del nacimiento de los ratones, la integración del ADN transgénico se comprobó mediante análisis Southern blot y PCR de ADN genómico por extracción de sangre de la cola. Para mantener la colonia de los

animales, los ratones Tg y sus correspondientes hermanos de genotipo salvaje (Wild type, Wt) con un fondo genético B6D2F1/OlaHsd se cruzaron sistemáticamente durante más de siete generaciones. El mantenimiento de la colonia se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Biomedicina de Valencia por la Dra. Casado.

Los ratones Tg y Wt con el fondo genético B6D2 / OlaHsd que se utilizaron en esta tesis, fueron machos con un peso corporal entre 25 y 30 g y una edad de 3 meses. Durante su estancia en las instalaciones se mantuvieron en condiciones de luz, presión y temperatura estables, así mismo fueron alimentados con agua y comida *ad libitum*, y tratados de acuerdo a las instrucciones de cuidado Institucional (Comisión de Bioética del Consejo de Investigación Español (CSIC), España).

3.3. Establecimiento de un modelo *in vivo* de esteatosis, obesidad y resistencia a insulina inducido por una dieta rica en grasa (HFD)

Los ratones Wt y Tg fueron alimentados con una dieta rica en grasa al 42% (*high fat diet*, HFD) (TD. 88137, Harlan Laboratories, Madison, WI, EEUU) *ad libitum* durante 12 semanas. Como controles de la dieta, ratones de ambos genotipos fueron tratados con una dieta estándar (*regular chow diet*, RCD) (A04-10, Panlab, Barcelona, España). Algunos de los animales Tg (n=7) alimentados con la dieta HFD fueron inyectados intraperitonealmente con DFU, un inhibidor selectivo de COX-2, a una dosis de 10 mg/kg/día durante todo el tratamiento, 5 días a la semana. A lo largo del tratamiento, se midieron los pesos de los animales, los pesos del alimento ingerido y el agua ingerida, dos veces por semana. Después de las 12 semanas del tratamiento, antes del sacrificio, un grupo de ratones fueron ayunados durante 6 horas, y se les inyectó intraperitonealmente una dosis de insulina 0.75 U/kg. Los ratones fueron sacrificados 15 minutos más tarde, y se obtuvo el hígado, tejido adiposo blanco epididimal o visceral (*epididymal white adipose tissue*, eWAT), inguinal (*inguinal white adipose tissue*, iWAT), y tejido adiposo marrón interescapular (*brown adipose tissue*, BAT). Rápidamente, algunos fragmentos se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C para su posterior análisis; otros fueron recolectados en una solución de sacarosa 30% en PBS o en una solución de fijación de tampón formalina 4% para la posterior tinción con hematoxilina y eosina y el análisis histológico (86).

Además, se obtuvo el plasma de los animales mediante la extracción de sangre de la vena cava inferior.

3.4. Pruebas de sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa in vivo

Se realizaron las pruebas de sensibilidad a la insulina (*insulin tolerance test*, ITT) y tolerancia a la glucosa (*glucose tolerance test*, GTT) al comenzar y al finalizar el tratamiento con la dieta HFD durante 12 semanas.

Para la prueba de sensibilidad a la insulina, se ayunó a los ratones durante 6 horas, y se inyectó intraperitonealmente insulina 0,75 U/Kg. A continuación, fueron medidos los niveles de glucosa con el glucómetro Accu-Check (Roche), extrayendo sangre de la vena de la cola de los animales antes de la administración de insulina y a 15, 30, 60 y 90 minutos posteriores a la inyección con insulina.

Para la prueba de tolerancia a la glucosa, los ratones fueron ayunados durante 16 horas. Después de este tiempo, se inyectó intraperitonealmente glucosa 2 g/kg y las glucemias fueron determinadas a los tiempos 0, 30, 60 y 90 minutos.

Además, se determinó la función pancreática y la RI usando el modelo de homeostasis de medición de la resistencia a insulina (*homeostasis model of assessment of insulin resistance*, HOMA-IR) descrito por Matthews y colaboradores en 1985. El HOMA-IR es un índice de resistencia a la insulina en el estado basal, y se calcula con la siguiente fórmula: $\text{HOMA-IR} = (\text{FPI} \times \text{FPG}) / 22.5$; donde FPI es la concentración plasmática de insulina en ayuno (mU/l) (*fasting plasma insulin concentration*, FPI) y FPG es la concentración plasmática glucosa en ayuno) (mmol/l) (*fasting plasma glucose*, FPG).

3.5. Aislamiento, cultivo y tratamiento de hepatocitos primarios

Para aislar los hepatocitos de ratones machos Wt y Tg, se utilizó la técnica de perfusión con colagenasa (92). Brevemente, la técnica consiste en perfundir el tejido hepático a través de la vena cava inferior con una solución de colagenasa compuesta por 1X Hank's balanced salt solution (HBSS) (Gibco), 1 mM HEPES pH 7.4, 0.2 mM EGTA and medio William's E (Sigma), 0.8 mg/ml colagenasa tipo 1 (Worthington, Biochemical Corporation, EEUU). Posteriormente, el homogeneizado se filtra con un filtro de 100 μm y se centrifuga a 70 g a 4°C durante 5 minutos. A continuación, las células se resuspendieron en un medio de cultivo específico de hepatocitos (*attachment cultured medium* AM), que contiene DMEM/F12 (Gibco), 20 mM HEPES pH 7.4, 0.05% NaHCO_3 , 5 mM glucosa, 10% FBS, 5 mg/ml BSA, 100 U/ml penicilina, 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomycin y 50 $\mu\text{g/ml}$. La suspensión celular se mezcló con una solución de Percoll isotónica (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suecia) y se centrifugó para obtener un gradiente de densidad. Una vez obtenidos los hepatocitos, se

sembraron 500.000 células por pocillo en placas de 6 cm y se cultivaron en medio AM a 37°C en atmósfera controlada con 5% CO₂ y 95% de humedad durante 48 horas. A continuación, las células fueron lavadas con PBS y congeladas a -80°C para su posterior análisis de expresión de los miARNs.

3.6. Aislamiento, cultivo y tratamiento de adipocitos marrones

Las células precursoras de tejido adiposo marrón (pre-adipocitos marrones) fueron aisladas a partir de la tejido marrón interescapular (BAT) de ratones Wt con 20 días de edad (44). Brevemente, la técnica consistió en disgregar el tejido adiposo marrón con una solución de colagenasa, eliminar los adipocitos maduros mediante flotación, filtrar con filtros de 25 µm y centrifugar para obtener los pre-adipocitos marrones. A continuación, a partir de un *pool* de 10 ratones, se sembraron las células precursoras en placas de 6 pocillos en medio DMEM suplementado con 3.5 nM insulina, 10 mM Hepes, 50 U/ml penicilina, 50 µg /ml estreptomicina, 25 µM ascorbato sódico y 10% suero de ternero recién nacido a 37°C en atmósfera con 5% CO₂ y 95% de humedad. Cuando las células alcanzaron un 80% de confluencia, se estimularon con 1 µM PGE₂ o 1 µM noradrenalina durante 24 horas para analizar la expresión proteica de UCP-1 por *Western Blot* (WB).

3.7. Determinación de la función termogénica *in vivo*

3.7.1. Calorimetría indirecta

Antes de finalizar el tratamiento de las 12 semanas, un grupo independiente de ratones Wt y Tg (n=4) fue introducido en jaulas metabólicas adaptadas a un sistema automatizado denominado PhenoMaster System (TSE systems, Bad Homburg, Alemania), el cual es capaz de tomar datos de diferentes parámetros calorimétricos. Brevemente, una vez introducidos los animales, se mantuvieron durante 24 horas para permitir su aclimatación, y posteriormente fueron monitorizados cada 10 minutos, el volumen de O₂ consumido (VO₂) y CO₂ (VCO₂) eliminado, la actividad de los ratones y la temperatura de la jaula durante 48 horas. Con dichas determinaciones, se midió el cociente respiratorio (*Respiratory exchange ratio*, RER) y se estimó el gasto energético (*Expenditure energy*, EE) utilizando las siguientes fórmulas: $RER = VCO_2 / VO_2$ y $EE = (3.815 + (1,23 \times RQ)) \times VO_2 \times 1,44$.

3.7.2. Experimento de exposición al frío

Un número de 8 ratones de ambos genotipos (Wt y Tg) de 3 meses de edad fueron expuestos a una temperatura de 28°C durante una semana para aclimatar a los animales. Posteriormente, los ratones fueron divididos en dos grupos: uno fue mantenido a 28°C, mientras que otro fue expuesto a 4°C en jaulas individuales durante 6 horas. Transcurrido este tiempo, los ratones fueron sacrificados y los tejidos adiposos BAT, eWAT e iWAT fueron extraídos y congelados en nitrógeno líquido para su posterior análisis.

3.8. Determinaciones de metabolitos y hormonas

Los niveles de PGE₂ fueron determinadas en hígado y en plasma mediante kits de ELISA de Arbor Assays (Ann Arbor, MI, EEUU) y Cayman Chemical, respectivamente.

Los niveles de glucosa en sangre fueron medidos mediante la extracción de una gota de la vena de la cola en Accu-Check Glucometer (Roche).

Tanto los niveles de las transaminasas, Alanina Aminotransferasa (ALT) y Aspartato Aminotransferasa (AST) como marcadores de daño hepático, como los niveles de triglicéridos y colesterol se midieron espectrofotométricamente con los kits específicos de BioSystem (BioSystems SA., Barcelona, España), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los niveles de ácidos grasos no esterificados (non-esterified fatty acids, NEFAs) se midieron en plasma mediante métodos enzimático con un kit específico de Wako (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Alemania), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Los niveles de insulina, la leptina y la adiponectina fueron determinadas mediante kits de ELISA (Millipore, Billerica, MA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.9. Cultivos celulares

La línea celular neonatal murina (*neonatal cell line*, NCL), fue obtenida inmortalizando hepatocitos proveniente de ratones mediante la infección con el antígeno viral SV40 como describe Martín-Sanz y colaboradores (92). Las células mostraron un fenotipo hepatocitario, además de expresar proteínas características de dicho tipo celular como albúmina, carbamoil fosfato sintasa y citoqueratina 18 (138).

La línea celular humana de hepatocito inmortalizada CCL-13 o CHL (Chang liver, CHL) fue adquirida en la *American Type Culture Collection* (ATCC) (Manassas, VA, EEUU). Los catálogos de la ATCC para esta línea celular CHL indican que también tiene marcadores de la línea HeLa. Para verificar la naturaleza hepática de los clones, tanto los que provienen de CHL como NCL, analizamos los marcadores hepáticos α -fetoproteína y albumina,

encontrándose éstos expresados significativamente en estas líneas (datos no mostrados), como describen Lee y colaboradores (79).

Las líneas celulares utilizadas se cultivaron a 37°C en atmosfera húmeda al 95% y CO₂ al 5%. El medio de cultivo (DMEM) se suplementó con 10% FBS y antibióticos (50 µg de penicilina, estreptomicina y gentamicina por cada ml).

3.10. Generación de líneas celulares hepáticas que expresan establemente hCOX-2

Para establecer las líneas celulares hepáticas murinas y humanas que expresan constitutivamente hCOX-2 en el hepatocito, se utilizó el plásmido pPyCAGIP, un vector con el promotor CAG y el gen de resistencia a puomicina, que fue cedido gentilmente por el Dr. I. Chambers (Universidad de Edimburgo, Edimburgo, Escocia). El gen de la COX-2 humana se amplificó por PCR a partir de un vector pcDNA1/Amp que contenía la secuencia completa de la COX-2. El vector pcDNA1/Amp fue amablemente provisto por el Dr. S. Prescott (Instituto del Cáncer Huntsman, Salk Lake City, UT, EEUU). Una vez amplificada la secuencia correspondiente al marco de lectura abierta (*Open reading frame*, ORF) sin codón de parada de la COX-2, se clonó en el sitio de restricción XhoI - NotI del plásmido pPyCAGIP. La orientación correcta y la integridad de la construcción se confirmaron por secuenciación.

Posteriormente, se sembraron 300.000 células/pocillo (aproximadamente con una confluencia del 70%) de las líneas NCL y CHL en placa de 6 pocillos y se incubaron durante toda la noche. Al día siguiente, se transfectaron con los plásmidos pPyCAGIP-hCOX-2 o el control pPyCAGIP durante 16 horas, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se cambió el medio de transfección por medio DMEM suplementado con 10% FBS y antibióticos (50 µg de penicilina, estreptomicina and gentamicina por cada ml). Después de 24 horas de incubación, se añadió 3 µg/ml puomicina, y a los 12 días, se seleccionaron, sembraron e incubaron colonias resistentes a puomicina durante 30 días en presencia de este antibiótico. Se comprobó la expresión de COX-2 mediante técnicas como PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR) y WB en los diversos clones obtenidos. Las células estables que expresaron hCOX-2 se denominaron NCL-C o CHL-C, y aquellas que no la expresan NCL-V o CHL-V, respectivamente.

3.11. Generación de plásmidos que expresan miARNs

Los precursores de los miARNs, miR-23b, miR-146b y miR-183, fueron generados en un plásmido específico de miARNs, el *pEGP-miR cloning vector* (Cell Biolabs, San Diego, CA, EEUU). Concisamente, las secuencias de la horquilla (*stem-loop*) de los miARNs fueron identificadas usando la base de datos *Sanger Center miRNA database* (disponible en: <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences>) y fueron amplificadas por PCR a partir de ADN genómico de células NCL. Las secuencias de los cebadores para la clonación de los precursores de miARNs se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la clonación de los precursores de los miARNs

| miARN | Orientación / Secuencia |
|---------------------|---|
| <i>pre-miR-23b</i> | F: 5' – TCGAGGATCCTGCTCCTCTATACAGTGCAGC - 3' F: 5' – TCGAGCTAGCAAGGGCTGGTGAGCATCTTC - 3' |
| <i>pre-miR-146b</i> | F: 5' – TCGAGGATCCACTGAATTCCATAGGCTGTGATCT -3' R: 5' – TCGAGCTAGCGTCTACAACGCAAGTTCCAGGA - 3' |
| <i>pre-miR-183</i> | F: 5' – TCGAGGATCCGTTGCTAAACTGCGGATGACAG - 3' R: 5' - TCGAGCTAGCCAAGCAGATGGTACTGGAACAG - 3' |

Los productos de la PCR fueron clonados entre la región de restricción *BamHI-NheI* del vector pEGP-miR. La orientación y la integración correcta de las construcciones fueron confirmadas mediante secuenciación.

3.12. Transfecciones

Se sembraron 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron durante 24 horas. Posteriormente, las células (con alrededor al 70% de confluencia) se transfectaron con los diferentes plásmidos (4 µg de p-EGP miR, 4 µg de pcDNA3.1-DDX5 (GenScript USA Inc. Piscataway, EEUU)) y/o ARN pequeños de interferencia (*small interference RNA*, siRNA) (50 nM de siCOX-2 humana ó 30 nM siDDX5 murina (Ambion, Austin, TX, EEUU)), usando y siguiendo las instrucciones de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Después de 16 horas de incubación, el medio de transfección fue reemplazado por medio DMEM suplementado con 10% FBS y antibióticos (50 µg de penicilina, estreptomicina y gentamicina por cada ml). A las 48 horas, las células fueron congeladas a -80°C para su posterior análisis mediante WB o qPCR.

Las secuencias de los siARNs están disponibles en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de los ARN de interferencia.

| ARN de interferencia | Secuencia |
|----------------------|--|
| siCOX-2 humano | F: 5'- GGGCUGUCCCUUUACUUCAtt -3' R: 5'- UGAAGUAAAGGGACAGCCCCtt-3' |
| siDDX5 murino | F: 5'- GAAGUCUACUUGCAUCUAUtt -3' R: 5'- AUAGAUGCAAGUAGACUUCcAa-3' |

3.13. Ensayo del gen reportero Luciferasa

Para analizar la unión del miR-183 a la región predictiva del 3'UTR del ARNm de IRS1, se diseñó en células NCL el ensayo del gen reportero luciferasa, Dual-Luciferase® Reporter Assay (Promega, EEUU). Para ello, en primer lugar, se buscó la secuencia del miR-183 en la base de datos miRBase (disponible en <http://www.mirbase.org>), así como la secuencia 3'-UTR de IRS1 de la base de datos Ensembl (disponible en <http://www.ensembl.org>). Posteriormente, usando herramientas bioinformáticas como RNAhybrid, se encontró un posible sitio de unión en la posición 190 (definiendo la posición 1 como el comienzo de la región 3'-UTR) de la región predictiva del motivo MRE en el 3'UTR de IRS1 en ratón. A continuación, se clonó el fragmento de 3'-UTR del ARNm de IRS1 (region 4750, referencia NM_010570) que incluye la región MRE donde se une el miR-183 y una secuencia mutante *downstream* del gen de la luciferasa (regiones de restricción *SacI* y *NheI*) dentro del vector pGL3-Promoter (Promega), para obtener los plásmidos pGL3 salvaje (Wt) y pGL3-mutado (Mut). Las secuencias de ratón clonadas fueron las siguientes:

Wt 5'-CTCAGGAGTTCATTGACTGAACTGCACGTTCTACATTGTGCCAAGCAACAAGAAAGCAC-3'y

Mut. 5'-CTCAGGAGTTCATTGACAGGACTGCACTCGCCGTATTTTCGGTCAGCAACAAGAAAGCAC-3'

Se sembraron 3×10^4 células/pocillo en placa de 24 pocillos y al día siguiente se transfectaron durante 18 h con pGL3-vacío (750 ng), pGL3-Wt (750 ng), pGL3-Mut (750 ng), pEGP-miR-183 (800 ng), pRenilla (50 ng), ó las diferentes combinaciones, usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) como indica el fabricante. A las 48 horas después de la transfección, las células fueron lavadas con PBS, lisadas y analizadas mediante luminiscencia usando *Dual-Luciferase® Reporter Assay* (Promega).

3.14. Modelo de resistencia a la insulina inducida por palmitato *in vitro*

Las células CHL y NCL fueron sembradas a una cantidad de 3×10^5 células/pocillo en placas de 6 pocillos a una confluencia aproximada del 70%. Después de la incubación de 24 horas, las células fueron incubadas con 2% FBS y 1% BSA durante 4 horas y tratadas con palmitato

400 μ M durante 16 horas. Posteriormente, las células fueron incubadas con 2% FBS y 1% BSA durante 2 horas y estimuladas con 1 ó 10 nM de insulina para evaluar sus vías de señalización mediante WB.

3.15. Análisis de la expresión proteica

3.15.1. Preparación de extractos totales

Aproximadamente, $2-3 \times 10^6$ de células en cultivo ó 50-100 mg de tejido se lavaron en PBS 1x y fueron homogeneizados en 1 ml (células) o 5-10 volúmenes (tejido) de solución tampón de extracto total (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 10% glicerol, 0,5% 3-((3-colamidopropil)dimetilamonio)-1-propanosulfonato (CHAPS), 5 mM β -mercaptoetanol) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma). Los extractos se agitaron en el vortex durante 30 minutos a 4°C y después se centrifugaron 20 minutos a 13000g, y el sobrenadante se mantuvo a -20°C.

3.15.2. Determinación de proteínas

La determinación de la concentración proteica de los extractos se realizó según el método descrito por Bradford en 1975 (10), usando albúmina de suero bovino como patrón. Este método se basa en la reacción entre los grupos sulfonados ácidos presentes en el azul Coomassie, azul brillante y los grupos amino libres presentes en aminoácidos básicos, principalmente arginina, lisina e histidina de las proteínas. Los cambios de absorbancia a 595 nm son directamente proporcionales a la concentración de proteína presente en la muestra, y fueron medidos en un lector de placas ATOM 340 ATC (SLT Lab Instruments).

3.15.3. Inmunodetección de proteínas (*Western Blot*)

Para el análisis de la expresión proteica mediante WB, cantidades iguales de proteína (20-30 μ g) se desnaturalizaron en condiciones reductoras a 95°C en un solución tampón Laemmli (200 mM Tris-HCl pH=6,8, 5,2% SDS, 40% glicerol, 7,5% β -mercaptetanol, 0,08% azul de bromofenol), se cargaron en geles verticales del 8-12% de poliacrilamida (acrilamida/bisacrilamida, 29:1) en condiciones desnaturalizantes con dodecil sulfato sódico (SDS) y se sometieron a electroforesis a 80V. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (polyvinylidene difluoride, PDVF) usando un método semi-seco (*Trans-blot SD Semi-Dry Electroforesis Transfer Cell Instruction Manual*, Bio-Rad Laboratories (1988)) a un amperaje constante de 1,5 A. Con el

fin de bloquear los sitios de unión inespecífica, las membranas se mantuvieron durante 1 hora en una solución de leche en polvo libre de grasa al 5% en PBS 1x. Transcurrido este tiempo, las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos (Tabla 3) durante toda la noche a 4°C. Tras la incubación, las membranas se lavaron 4 veces con PBS-T (PBS 1x y 0,1% de Tween-20) durante 15 minutos cada lavado, y se expusieron durante 1 hora a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado de HRP (peroxidasa de rábano picante) anti-conejo o anti-ratón. Después de la incubación con los anticuerpos, se volvieron a lavar y las proteínas se visualizaron con el sistema de detección mediante quimioluminiscencia ECL GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK). Se realizaron diferentes tiempos de exposición para cada membrana usando una cámara acoplada a un analizador de imágenes Luminiscente (Gel-Doc, Bio-Rad) para asegurar la linealidad de la intensidad de las bandas en cada experimento. El análisis densitométrico se realizó usando el software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>), y se expresó en unidades arbitrarias.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas

| Anticuerpo | Manufacturer | Nº Catalogo |
|--------------------------|---------------------------|-------------|
| Acetil-lisina | Merck Millipore | 06-933 |
| β-actina | Santa Cruz Biotechnology | A5441 |
| p-Akt (Ser473) | Cell Signaling Technology | 4060 |
| Akt | Cell Signaling Technology | 9272 |
| p-AMPK (Thr 172) | Cell Signaling Technology | 2535S |
| AMPK | Cell Signaling Technology | 2532S |
| COX-2 | Cayman Chemical | 160107 |
| DDX5 | Cell Signaling Technology | 9877 |
| DDX17 | Abcam | ab70184 |
| DGCR8 | Proteintech | 10996-1-AP |
| Dicer | Santa Cruz Biotechnology | sc-30226 |
| Drosha | Cell Signaling Technology | 3364 |
| p-IR (Tyr1158/1162/1163) | Merck Millipore | 07-841 |
| IR | Cell Signaling Technology | 3020 |
| IRS1 | Merck Millipore | 06-248 |
| IRS2 | Merck Millipore | 06-506 |
| PTP1B | Merck Millipore | 07-088 |
| α-tubulina | Sigma | T9026 |
| UCP-1 | Abcam | ab10983 |

3.15.4. Inmunoprecipitación de proteínas

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación se utilizó proteína A/G sefarosa (Santa Cruz), que fue lavada tres veces con PBS antes de usarse. Se añadieron 25 µl de proteína A/G sefarosa, ya lavada, a 500 µg de proteína total. Tras incubar 1 hora a 4°C en agitación (con el objetivo de pre-lavar el medio de proteínas que se puedan unir inespecíficamente a la proteína A), se centrifugó a 12000g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. Seguidamente, se añadieron los anticuerpos anti-COX-2, anti-Acetil o anti-Drosha (Tabla 3) en condiciones saturantes (1 µg), y se incubó toda la noche a 4°C en agitación. Al día siguiente, se añadió 25 µl de proteína A/G sefarosa (pre-lavada) y se incubó durante 4 horas a 4°C en agitación. Posteriormente, se centrifugó a 12000g durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. A continuación se lavó el precipitado dos veces con PBS que contiene 1 mM PMSF más Tritón X-100, y se resuspendió en tampón Laemmli (Tris-HCl pH 6,8 1M, SDS 20%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,05%). Se incubó durante 5 minutos a 95°C (para desnaturalizar la proteína y separarla de la proteína A), y se centrifugó a 12000g durante 1 minuto, cargando el sobrenadante en el gel de electroforesis. Como control negativo, se incubó la muestra con un anticuerpo del mismo isotipo que el utilizado para inmunoprecipitar la proteína de interés.

3.16. Análisis de la expresión génica

3.16.1. Aislamiento de ARN

Las células, los fragmentos de hígado de ratón y humanos, eWAT, iWAT o BAT fueron lavados con PBS frío, y homogeneizados con TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) en tubos de propileno de 1,5 ml libres de nucleasas, según las instrucciones del proveedor. A continuación, se añadió a cada muestra 200 µl de cloroformo frío por cada 1 ml de TRIzol y se agitaron vigorosamente durante 30 segundos. Posteriormente se mantuvieron 15 minutos a 4°C y se centrifugaron durante 15 minutos a 12000g a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml, y se le añadió el mismo volumen de isopropanol frío que el de TRIzol inicial. A continuación, se mantuvieron durante toda la noche a -20°C con el fin de precipitar el ARN. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 12000g a 4°C y se aspiró el sobrenadante. El precipitado se lavó varias veces con etanol 75% frío y se resuspendió en agua pura pura libre de nucleasas. Finalmente, se cuantificó la cantidad del ARN con el espectofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se determinó la calidad y la integridad con el Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA).

3.16.2. Aislamiento de miARNs

Las células y los fragmentos de hígado de ratón y humanos se lavaron en frío, se homogeneizaron en 700 µl de Quiazol (Qiagen, Valencia, CA, EEUU) y se purificó en mini columnas con el kit *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen) según las instrucciones del proveedor. Posteriormente, el homogeneizado se agitó durante 1 minuto y se incubó durante otros 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se añadió 140 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó durante 2-3 minutos a temperatura ambiente. A continuación se centrifugó a 12000g durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de 1,5 ml y se le añadió 525 µl de etanol 100%. Después, todo el volumen fue transferido a una mini columna y se centrifugo a 8000g durante 15 segundos a temperatura ambiente para facilitar la unión de los miARNs a la columna. Más tarde, la columna se sometió a sucesivos lavados con 700 µl de tampón RWT, 500 µl de tampón RPE dos veces. Para eliminar todo el volumen de tampón, la columna se centrifugó a 8000g durante 2 minutos a temperatura ambiente y se transfirió la columna a un nuevo tubo. A continuación, los miARNs fueron eluidos con 30 µl de agua libre de nucleasas centrifugando la columna a 8000g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Finalmente, se cuantificó la cantidad de ARN con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 y se determinó la calidad e integridad con el Agilent Bioanalyzer.

3.16.3. Determinación de los niveles de expresión de los miARNs mediante *array* de PCR cuantitativa en tiempo real

Los miARNs hepáticos provenientes de 8 ratones Wt y 8 ratones Tg fueron extraídos, purificados y analizados su calidad e integridad como se describe anteriormente. Para el análisis de expresión de miARNs, se usó un microarray de RT-PCR denominado Mouse Genome V2.0 RT2 miRNA PCR Array System (SA Biosciences, Frederick, MD, EEUU), en el cual se incluían 440 secuencias únicas de miARNs. Para la síntesis de ADNc, el miARN fue transcrito inversamente usando el kit RT²miRNA first-strand kit (SA Biosciences). Los ADNc sintetizados fueron añadidos con una mezcla denominada RT² SYBR green PCR master mix y ésta fue cargada dentro de 6 placas específicas de PCR array que constaban de 96 pocillos. Cada pocillo contenía un cebador universal y un cebador específico para uno de los 440 miARNs. El array de PCR fue diseñado usando los siguiente parámetros del termociclador MyQ (BioRad): 1 ciclo a 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos. La inducción

de cambio en los niveles de expresión de los microARNs fue calculada con el software *RT² miRNA PCR array data analysis web-based* (SA Biosciences) (111). El cambio en los niveles de expresión de cada miRNA fue determinado comparando los valores provenientes de los ratones Tg versus Wt. Los resultados obtenidos del *microarray* fueron posteriormente validados mediante RT-PCR en tiempo real de los miARNs específicos.

A continuación, para determinar las probables vías de señalización y/o funciones biológicas en las que participan los miARNs estudiados, se usó una plataforma llamada *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) que permite indentificar posibles genes diana candidatos.

3.16.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real

La transcripción inversa de ARNm se realizó en un termociclador MyQ (BioRad) con el kit *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche Applied Science, Penzberg, Alemania) siguiendo las instrucciones del proveedor. El primer paso consistió en desnaturalizar el ARN para facilitar el anillamiento de los hexámeros y fue llevado a un volumen final de 13 µl conteniendo 1 µg de ARN total y 60 µM de cebadores hexámeros. Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a 65°C y posteriormente a 4°C. A continuación se realizó el segundo paso que es la elongación de las nuevas cadenas de ADN. Para ello, se añadió a cada tubo anterior 1X de tampón de retrotranscripción, 20 U de inhibidor de ARNasas, 1 mM de dNTPs y 10 U de la transcriptasa inversa TRT. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 50°C, y finalmente 5 minutos a 85°C. Como controles negativos se incluyeron muestras en las que omitió la enzima transcriptasa. El ADNc sintetizado fue diluido 10 veces en agua pura libre de nucleasas.

La transcripción inversa de los miARN se realizó en un termociclador MyQ con el kit *NCodeTM miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del proveedor. El primer paso consistió en una reacción de poliadenilación en el extremo 3' de los miRNAs y fue llevado a un volumen de 25 µl conteniendo 0,5 µg de ARN total, 1X de tampón de reacción, 40 µM de ATP, 2,5 mM de MnCl₂ y un volumen de 0,5 µl de Poly A polimerasa. Las muestras se incubaron durante 10 minutos a 37°C. El siguiente paso fue facilitar el anillamiento de los cebadores, para ello se mezclaron en un volumen final de 8 µl, 4 µl de ARN poliadenilado, 1 µl de tampón de anillamiento y 3 µl de cebador de retrotranscripción universal, y se incubó durante 5 minutos a 65°C. El último paso consistió en la elongación de las nuevas cadenas y para ello a la mezcla anterior, se le añadió para

llegar a un volumen final de 20 µl, 1X de tampón de elongación y 2 µl de transcriptasa *SuperSIII R-out Mix*. La mezcla final fue incubada durante 50 minutos a 50°C y 5 minutos a 85°C. Como controles negativos se incluyeron muestras en las que omitió la enzima transcriptasa. Finalmente, el ADNc sintetizado fue diluido 10 veces en agua pura libre de nucleasas.

La PCR cuantitativa (usando oligos) de los ARNm y miARNs se realizó en un volumen final de 20 µl, conteniendo 8 µl de cDNA, 0,5 µM de los cebadores (en el caso de los miARN se usó el cebador universal que contiene el kit *NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis*) y 10 µl de *FastStart Universal SYBR Green Master* (Roche). El programa de la PCR de los ARNm consistió en: 3 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C; y el programa de la PCR de los miARNs fue el siguiente: 3 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un aparato de PCR cuantitativa modelo MyQ. La secuencia de los cebadores utilizados para la detección de ARNm y miARNs se muestran en las Tabla 4 y 5, respectivamente.

Tabla 4. Cebadores utilizados para la detección de los ARNm.

| Nombre del gen | Orientación / Secuencia |
|----------------|---|
| <i>Acaca</i> | FP: 5' -TGGAGCTAAACCAGCACTCCCGA- 3' RP: 5' -GCTGGATCTCATGTGAAAGGCCAA- 3' |
| <i>Acox1</i> | FP: 5' -TCGAAGCCAGCGTTACGAG- 3' RP: 5' -GGTCTGCGATGCCAAATTCC- 3' |
| <i>Akt2</i> | FP: 5' -ACGTGGTGAATACATCAAGACC- 3' GCTACAGAGAAATTGTTTCAGGGG |
| <i>AKT2</i> | FP: 5' -ACCACAGTCATCGAGAGGACC- 3' RP: 5' -GGAGCCACACTTGTAAGTCCA- 3' |
| <i>Cd36</i> | FP: 5' -AGATGACGTGGCAAAGAACAG- 3' RP: 5' -CCTTGGCTAGATAACGAACCTCTG- 3' |
| <i>Cpt1a</i> | FP: 5' -TCAATCGGACCCTAGACACC- 3' RP: 5' -CTTTCGACCCGAGAAGACCT- 3' |
| <i>Dio2</i> | FP: 5' -GCTTACGGGGTAGCCTTTGA- 3' RP: 5' -CCAGCCAACTTCGGACTTCT- 3' |
| <i>Fasn</i> | FP: 5' -TCGGCGGGTCTATGCCACGA- 3' RP: 5' -GTCACCCACCTTGGTGCCCG- 3' |
| <i>Gck</i> | FP: 5' -TGAGCCGGATGCAGAAGGA- 3' RP: 5' -GCAACATCTTTACACTGGCCT- 3' |
| <i>Il-1b</i> | FP: 5' -AGAAGCTGTGGCAGCTACCTG- 3' RP: 5' -GGAAAAGAAGGTGCTCATGTCC- 3' |
| <i>Il-6</i> | FP: 5' -GAGGATACCACTCCCAACAGACC- 3' |

| | |
|----------------|---|
| <i>Insig1</i> | RP: 5' -AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA- 3' FP: 5' -CTAGTGCTCTTCTCATTTGGCG- 3' |
| <i>INSIG1</i> | RP: 5' -AGGGATACAGTAAACCGACAACA- 3' FP: 5' -GCCTACTGTACCCCTGTATCG- 3' |
| <i>Insig2</i> | RP: 5' -TGGTTAATGCCAACAAAACTGC- 3' FP: 5' -GGAGTCACCTCGGCCTAAAAA- 3' |
| <i>INSIG2</i> | FP: 5' -CAAGTTCAACACTAATGCCAGGA- 3' FP: 5' -TAATGCGGTGTGTAGCAGTCT- 3' |
| <i>Irs1</i> | RP: 5' -GTCCAATGGATAGTGCAGCCA- 3' FP: 5' -CTCCTGCTAACATCCACCTTG- 3' |
| <i>IRS1</i> | FP: 5' -AGCTCGCTAACTGAGATAGTCAT- 3' FP: 5' -CCCAGGACCCGCATTCAAA- 3' |
| <i>Irs2</i> | RP: 5' -GGCGGTAGATACCAATCAGGT- 3' FP: 5' -ACCGACTTGGTCAGCGAAG- 3' |
| <i>IRS2</i> | FP: 5' -CACGAGCCCCGTAGTTGTCAT- 3' FP: 5' -CAGTGCTGAGCGTCTTCTTTT- 3' |
| <i>Lipc</i> | RP: 5' -ACCTACGCCAGCATTGACTT- 3' FP: 5' -CCCTGGCATACCAGCACTAC- 3' |
| <i>Lipe</i> | RP: 5' -CTCCGAGAAAACCTTCGCAGATT- 3' FP: 5' -CCAGCCTGAGGGCTTACTG- 3' |
| <i>Pck1</i> | RP: 5' -CTCCATTGACTGTGACATCTCG- 3' FP: 5' -GGGCCGCTGGATGTCCGAAG- 3' |
| <i>Pnpla2</i> | RP: 5' -GGTGCGGCCTTTCATGCACC- 3' FP: 5' -CAACGCCACTCACATCTACGG- 3' |
| <i>Ppara</i> | RP: 5' -GGACACCTCAATAATGTTGGCAC- 3' FP: 5' -AGAGCCCCATCTGTCTCTC- 3' |
| <i>Pparg</i> | RP: 5' -ACTGGTAGTCTGCAAAACCAAA- 3' FP: 5' -TCAATCGGACCCTAGACACC- 3' |
| <i>Ppargc1</i> | RP: 5' -CTTTCGACCCGAGAAGACCT- 3' FP: 5' -AAGTGTGGAACCTCTCTGGAACCTG- 3' |
| <i>Prdm16</i> | RP: 5' -GGGTATCTTGGTTGGCTTTATG- 3' FP: 5' -GGCCCAGCACTTGAATTTG- 3' |
| <i>Prkca</i> | RP: 5' -GGCAATGCAGAGTAGAGGCA- 3' FP: 5' -AGAGGTGCCATGAGTTCGTTA- 3' |
| <i>PRKCA</i> | RP: 5' -GGCTTCCGTATGTGTGGATTTT- 3' FP: 5' -ATGTCACAGTACGAGATGCAAAA- 3' |
| <i>Rplp0</i> | RP: 5' -GCTTTCATTCTTGGGATCAGGAA- 3' FP: 5' -ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG- 3' |
| <i>RPLP0</i> | RP: 5' -TCCCACCTTGTCTCCAGTCT- 3' FP: 5' -AGATGCAGCAGATCCGCAT- 3' |
| <i>Scd1</i> | RP: 5' -GTTCTTGCCCATCAGCACC- 3' FP: 5' -TTCTTGCGATACACTCTGGTGC- 3' |
| <i>Tnf-α</i> | RP: 5' -CGGGATTGAATGTTCTTGTCGT- 3' FP: 5' -CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA- 3' |
| <i>Tsc1</i> | RP: 5' -TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC- 3' FP: 5' -CAGCCGGTATTGCACATCCT- 3' |

| | |
|--------------|-------------------------------------|
| <i>TSCI</i> | RP: 5' -GGATAAACGGGTAGCAGCTTTG- 3' |
| | FP: 5' -GTGGCGGAAGTCTATCTCGTC- 3' |
| <i>Ucp-1</i> | RP: 5' -GCAAGGGTACATTCCATAAAGGC- 3' |
| | FP: 5' -TTCAGGGAGAGAAACACCTGC- 3' |
| | RP: 5' -TTCACGACCTCTGTAGGCTG- 3' |

Tabla 5. Cebadores utilizados para los miARNs primarios y maduros.

| Nombre del miARN | Orientación / Secuencia |
|----------------------------------|--|
| <i>hsa/mmu-Let-7^a</i> | F: 5' - GGGTGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT - 3' |
| <i>hsa/mmu-miR-23b</i> | F: 5' - ATCACATTGCCAGGGATTACC - 3' |
| <i>hsa/mmu-miR-146b</i> | F: 5' - GTGAGAACTGAATTCCATAGGCT - 3' |
| <i>hsa/mmu-miR-183</i> | F: 5' - GGTATGGCACTGGTAGAATTCAC - 3' |
| <i>mmu-pri-miR-23b</i> | F: 5' - TGCTCCTCTATACAGTGCAG - 3' |
| | R: 5' - AAATCAGCATGCCAGGAACC-3' |
| <i>mmu-pri-miR-146b</i> | F: 5' - CAAGGCACACACTGAATAAAATG - 3' |
| | R: 5' - ACCAGAACTGAGTCCCTAG- 3' |
| <i>mmu-pri-miR-183</i> | F: 5' - AGGAGCAGAGGAGGTCTTT - 3' |
| | R: 5' - TATGGCACTGGTAGAATTCAC - 3' |
| <i>mmu-pre-miR-23b</i> | F: 5' - TGCTTGGGTTTCCTGGCAT- 3' |
| | R: 5' - GGTTGCGTGGTAATCCCT- 3' |
| <i>mmu-pre-miR-146b</i> | F: 5' - CTGAGAACTGAATTCCATAGG - 3' |
| | R: 5' - GCACCAGAAGTGAGTCC - 3' |
| <i>mmu-pre-miR-183</i> | F: 5' - CTGTGTATGGCACTGGTAG - 3' |
| | R: 5' - CTGTTTATGGCCCTTCGGT- 3' |
| <i>hsa/mmu-U6</i> | F: 5' - CTTCGGCAGCACATATACT - 3' |
| | R: 5' - AAAATATGGAACGCTTCACG - 3' |

El nivel de expresión de cada ARNm o miARN se normalizó frente a los controles internos *Rplp0/RPL0* (36b4/36B4) o U6, respectivamente. Para cada gen se obtuvieron los datos de Ct (Cycle Threshold, ciclo en el que los productos de PCR inician la fase exponencial de la amplificación), usando un programa específico (Bio-Rad iQ5 software). Para comprobar los niveles de expresión de un mismo ARNm o miARN en dos muestras diferentes se usó el método de $\Delta\Delta Ct$ (84). En primer lugar se calculó el valor de ΔCt de la muestra que queremos analizar y de la muestra control usando la fórmula $\Delta Ct = Ct_{\text{gen muestra problema}} - Ct_{\text{control interno}}$. Posteriormente se calculó el valor de $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra problema}} - \Delta Ct_{\text{muestra control}}$. El valor del cociente (veces de incremento o inhibición) entre las dos muestras se calculó como $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.17. Pacientes

Este estudio incluyó a 10 pacientes no diabéticos con un diagnóstico clínico de esteatosis no alcohólica (*non alcoholic steatosis*, NAS), a los cuales se les sometió a una biopsia hepática para el diagnóstico. Además fueron analizados más de 10 sujetos con una histología hepática normal (*normal liver*, NL). El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Universitario Princesa (Madrid, España), el cual se basa en las normas éticas de la Declaración de Helsinki 1975.

3.18. Análisis estadístico

Los datos son expresados como la media \pm error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas fueron evaluadas con la prueba t de Student para observaciones de 2 grupos. El análisis estadístico de las diferencias entre más de 2 grupos, se realizó mediante ANOVA de una vía seguido por la prueba de Tukey's. El software que se utilizó para el análisis estadístico fue GraphPad Prism 5. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

4. Resultados

4.1. La expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protege frente a la esteatosis, obesidad y resistencia a la insulina inducida por una dieta HFD

4.1.1. Expresión y funcionalidad de hCOX-2 en el hígado de ratones Tg

En primer lugar, se confirmó la expresión constitutiva de la COX-2 humana (hCOX-2) mediante WB en extractos de hígado de ratones Wt y Tg. Como se observa en la Figura 11A, sólo se detectó expresión de proteína de hCOX-2 en el hígado de los ratones Tg a niveles tan elevados que fueron comparables con los producidos en hepatocitos fetales después de la estimulación con LPS (11, 92) y de la regeneración del hígado tras hepatectomía parcial (14, 94). No se detectó la expresión de proteína hCOX-2 en el hígado de ratones Wt. Además, se confirmó la funcionalidad de la enzima, midiendo los niveles de la prostaglandina E₂ (PGE₂), uno de los metabolitos principales derivados de la activación de la enzima COX-2 (Figura 11B).

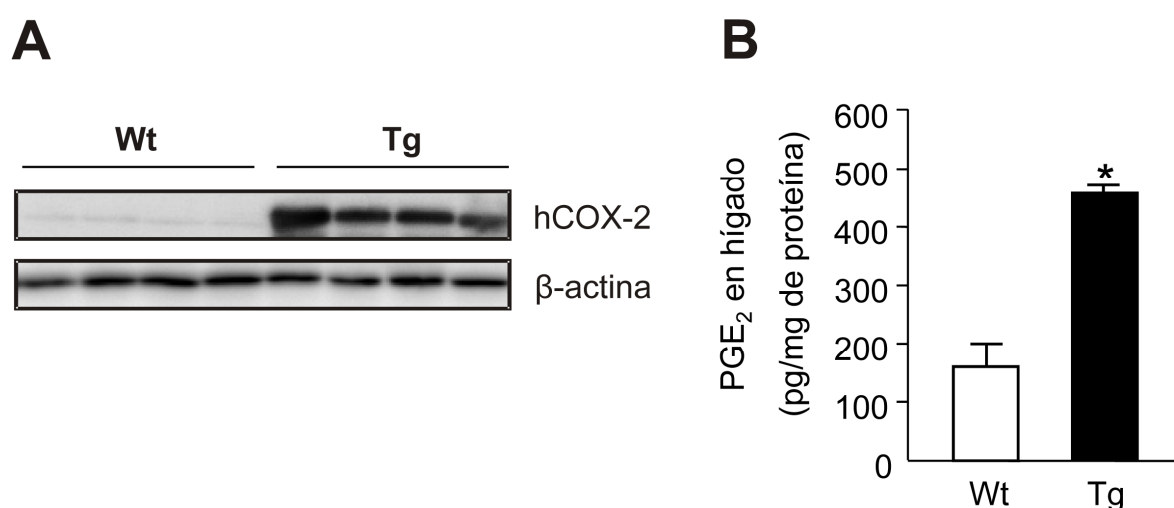


Figura 11. hCOX-2 se expresa constitutivamente en el hígado de los ratones Tg. A) Western Blot representativo de la expresión de proteína de hCOX-2 en extractos totales de hígados de ratones Wt y Tg, usando como control de carga β-actina. B) Niveles de PGE₂ intrahepática determinados por ELISA en extractos totales de ratones Wt y Tg. Los datos se representan como la media ± error estándar de 4 animales por genotipo. *p<0.05 *versus* Wt.

4.1.2. COX-2 mejora la sensibilidad a la insulina y la tolerancia a la glucosa en condiciones basales (dieta RCD)

Para determinar si la expresión ectópica de COX-2 en células hepáticas afectaba a la sensibilidad frente a la insulina en ratones con una RCD, se realizaron test de sensibilidad a la insulina (TTI) y tolerancia a la glucosa (TTG) a los animales Wt y Tg. Los ratones Tg

mostraron una mayor sensibilidad a la insulina exógena (Figura 12A), así como una mayor tolerancia a la glucosa comparado con los ratones Wt (Figura 12B).

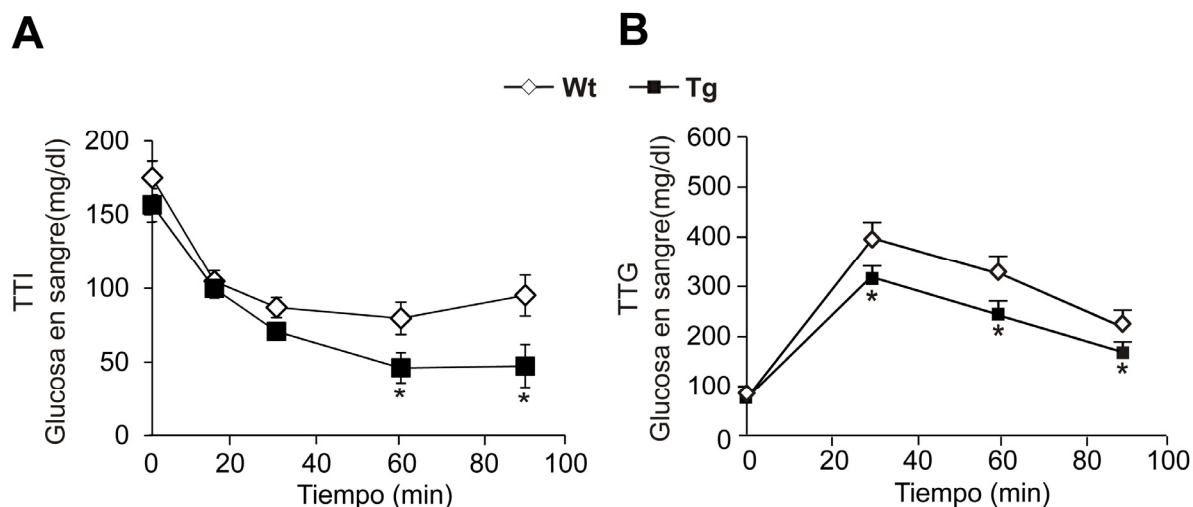


Figura 12. Los ratones Tg presentaron una mayor sensibilidad a la insulina exógena y tolerancia a la glucosa en condiciones basales. A) Test de sensibilidad a la insulina después de un ayuno de 6 horas **B)** y test de tolerancia a la glucosa después de un ayuno de 16 horas, en ratones Wt y Tg. Los datos se representan como la media \pm error estándar de 4 animales por genotipo (dos experimentos independientes). * $p < 0.05$ versus Wt.

Además, para confirmar que los cambios descritos se debían a la expresión de h-COX-2 en el hepatocito, y no a cambios en la ingesta de comida y por tanto asociados con el peso corporal, se pesó el alimento de la dieta RCD. No se encontraron diferencias ni en la ingesta ni en el peso corporal entre los ratones Wt y Tg (datos no mostrados).

4.1.3. COX-2 confiere una mayor sensibilidad frente a la insulina y tolerancia a la glucosa con cambios en el peso corporal en ratones tratados con una dieta HFD

Teniendo en cuenta los resultados observados que indicaban una mayor sensibilidad a la insulina en ratones con expresión hepática de hCOX-2, se alimentaron a los ratones Wt y Tg durante 12 semanas con una dieta HFD, utilizada como modelo murino que produce resistencia a insulina (107, 109).

Durante el tratamiento con la HFD, se pesaron tanto los animales, como la cantidad de alimento ingerida. También se pesó el hígado y el tejido adiposo eWAT después del sacrificio. Los ratones Tg no tuvieron un aumento significativo en la ganancia de peso como ocurrió en los ratones Wt durante el tratamiento con la HFD. Del mismo modo, tanto el tamaño del tejido adiposo eWAT como el peso del hígado de los ratones Tg fueron significativamente menores comparado con los de los Wt (peso del hígado Tg versus Wt: 1.29 ± 0.05 g y 1.63 ± 0.11 g; $P < 0.05$) (Figura 13A–D). Además, los ratones Tg tratados

con DFU, un inhibidor selectivo de COX-2, presentaron valores intermedios en el peso corporal (Figura 13C). Los ratones Tg mostraron un 20% menos de ganancia de peso sin cambios significativos en los pesos iniciales. Además, no se encontraron cambios en la ingesta entre los ratones Wt y Tg tratados con la dieta HFD (Figura 13D).

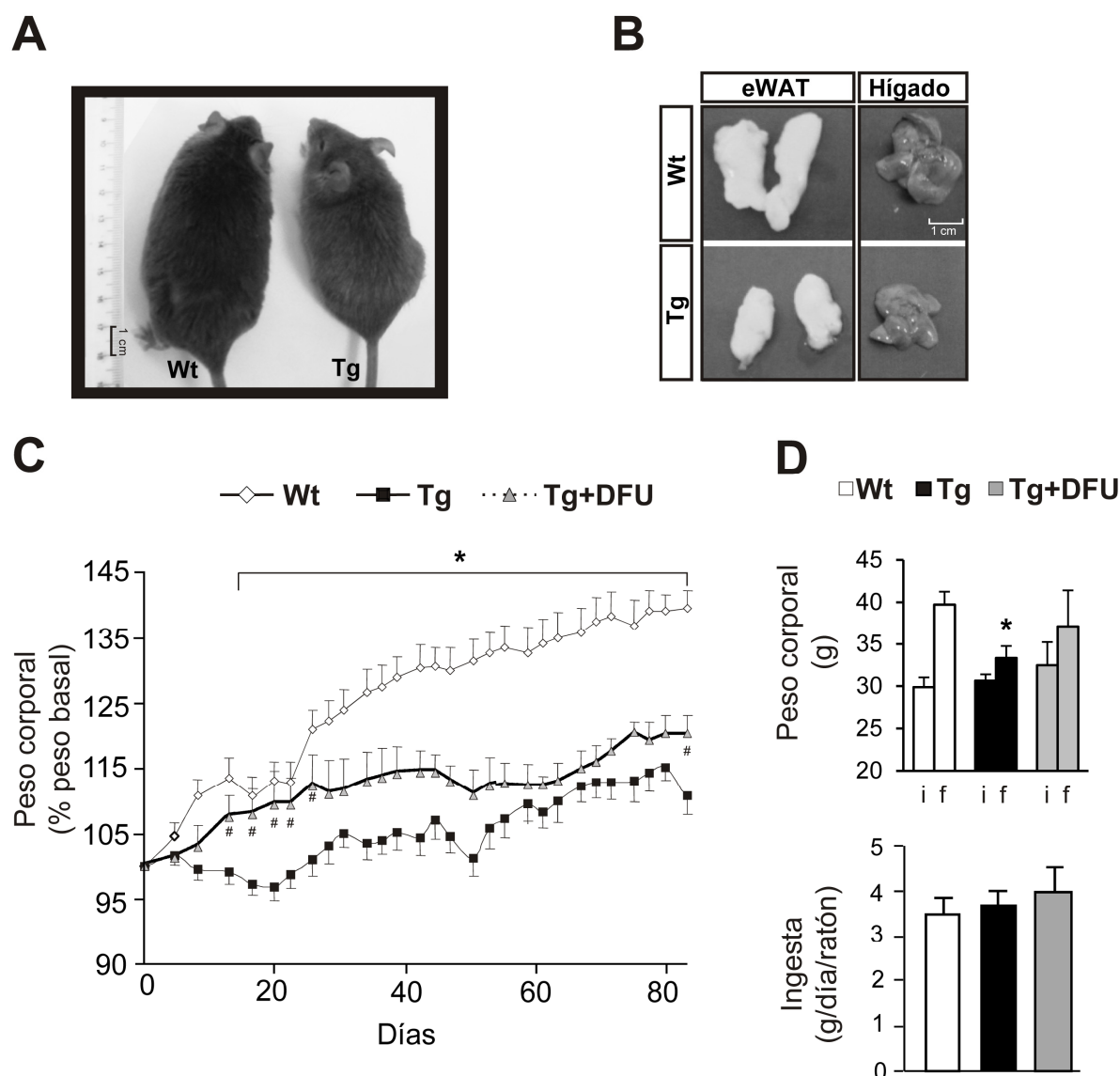


Figura 13. Los ratones Tg están protegidos frente a la ganancia de peso sin cambios en la ingesta durante el tratamiento con la dieta HFD. Los ratones Wt y Tg fueron alimentados con una dieta HFD ad libitum durante 12 semanas. Un grupo adicional de ratones Tg fue tratado con DFU 10 mg/kg/día mediante inyección intraperitoneal 5 veces por semana durante todo el tratamiento con la HFD. **A)** Fotografía representativa de un ratón Wt y Tg. **B)** Fotografía representativa del tejido adiposo eWAT e hígado de ratones Wt y Tg. **C)** Curva de peso corporal de ratones Wt, Tg y Tg tratado con DFU, expresado como porcentaje del peso corporal basal. **D)** Peso corporal inicial y final e ingesta de los ratones Wt, Tg y Tg tratado con DFU. Los valores se representan como la media \pm error estándar de 7 animales por genotipo (dos experimentos independientes). *p<0.05 versus Wt, #p<0.05 versus Tg.

Además, para analizar el efecto de la HFD en la homeostasis de glucosa, se realizaron las correspondientes pruebas de tolerancia a la glucosa y a la insulina antes del sacrificio de los ratones. Al igual que lo obtenido con la dieta RCD, los ratones Tg presentaron una mejor respuesta a la insulina exógena (Figura 14A) y mayor tolerancia a la glucosa (Figura 14B).

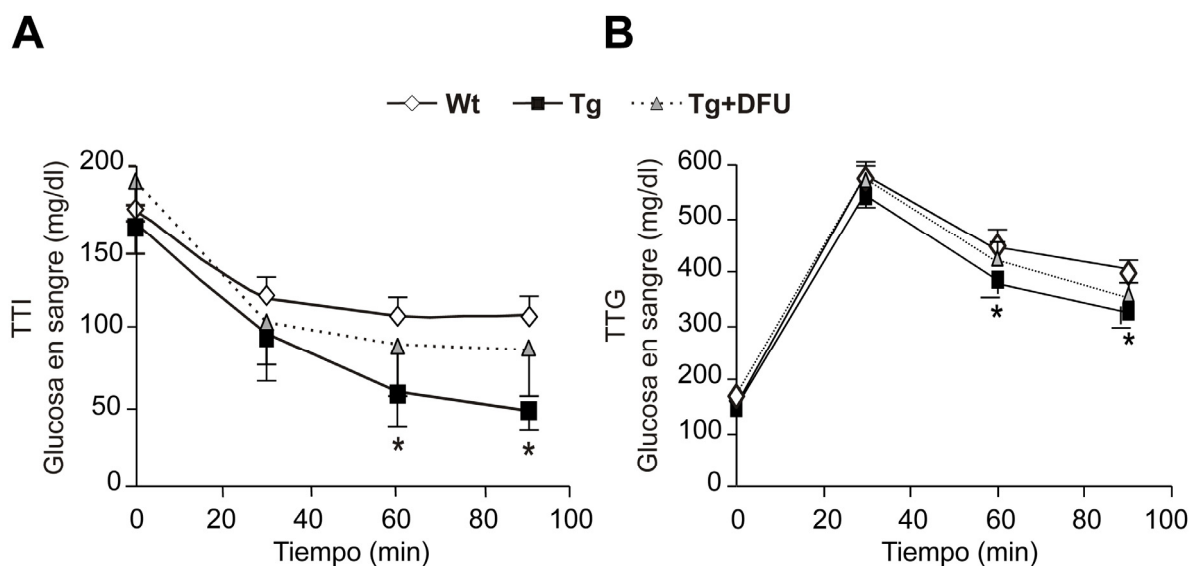


Figura 14. Los ratones Tg presentan una mayor sensibilidad frente a la insulina exógena y tolerancia a la glucosa con el tratamiento de HFD. A) Test de tolerancia a la insulina (TTI) después de un ayuno de 6 horas **B)** y test de tolerancia a la glucosa (TTG) después de un ayuno de 16 horas en ratones Wt y Tg. Los datos se representan como la media \pm error estándar de 6 animales por genotipo. * $p < 0.05$ versus Wt.

4.1.4. COX-2 protege frente a la esteatosis hepática, adiposidad e inflamación en ratones tratados con una dieta HFD

El tratamiento crónico con la dieta HFD produce acumulación de lípidos en el hígado (esteatosis hepática), un proceso característico de la enfermedad de hígado graso no alcohólica (139). Bajo estas condiciones nutricionales los ratones Wt desarrollaron una esteatosis de grado más severo en comparación a los Tg (Figura 15A), mientras que los ratones Tg tratados con DFU revertieron parcialmente este efecto, incluyendo acumulación masiva de grandes gotas lipídicas y un incremento significativo de los triglicéridos hepáticos (Figura 15B). En consonancia, los grados de esteatosis en el hígado (steatosis score), definido por la *Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network Scoring System Definitions* (75), correspondientes a los ratones Wt, Tg y Tg tratados con DFU fueron 3 ± 0.00 , $2 \pm 0.41^*$ y 2.40 ± 0.40 (* $p < 0.05$ versus Wt-HFD), respectivamente.

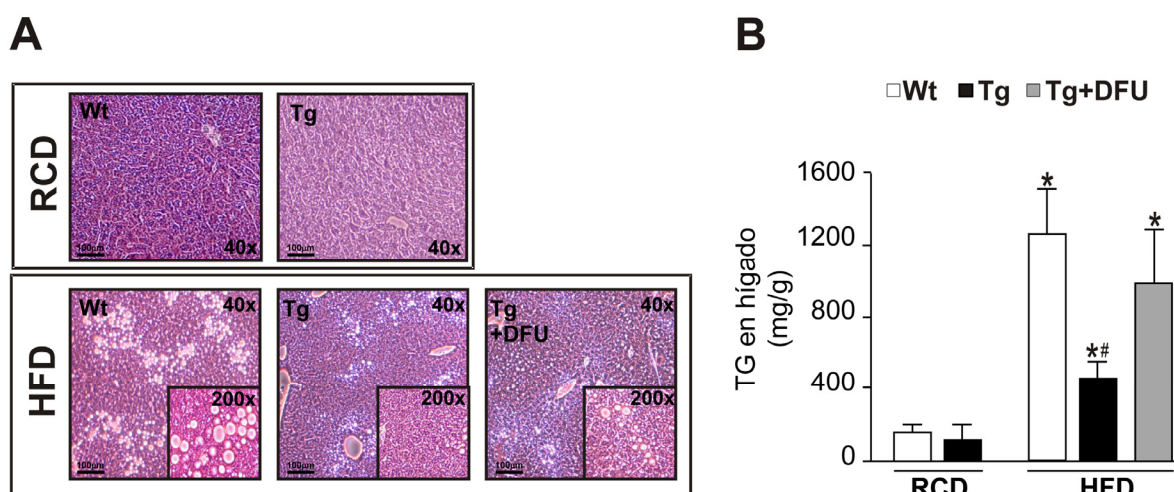


Figura 15. Los ratones Tg están protegidos frente a la esteatosis hepática producida por una dieta HFD. A) Imagen representativa de cortes de tejido hepático teñido con eosina y hematoxilina de ratones tratados con una dieta RCD (Wt y Tg) y con una dieta HFD (Wt, Tg y Tg tratado con DFU). **B)** Niveles de triglicéridos (TG) en hígado de los ratones medido mediante ensayos enzimáticos en todos los grupos experimentales. Los datos se representan como la media \pm error estándar de 6 animales por genotipo. * $p < 0.05$ versus Wt-RCD; # $p < 0.05$ versus Wt-HFD.

La dieta HFD en ratones provoca un característico perfil inflamatorio, el cual podría ser crítico para el desarrollo de intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (61). Por esta razón, se analizaron los niveles de expresión de genes pro-inflamatorios en el hígado. Como se muestra en la Figura 16, los niveles de expresión de los ARNm de TNF- α , IL-1 β e IL-6 aumentaron en el hígado de los ratones Wt tras el tratamiento con la dieta HFD, no siendo así en los ratones Tg.

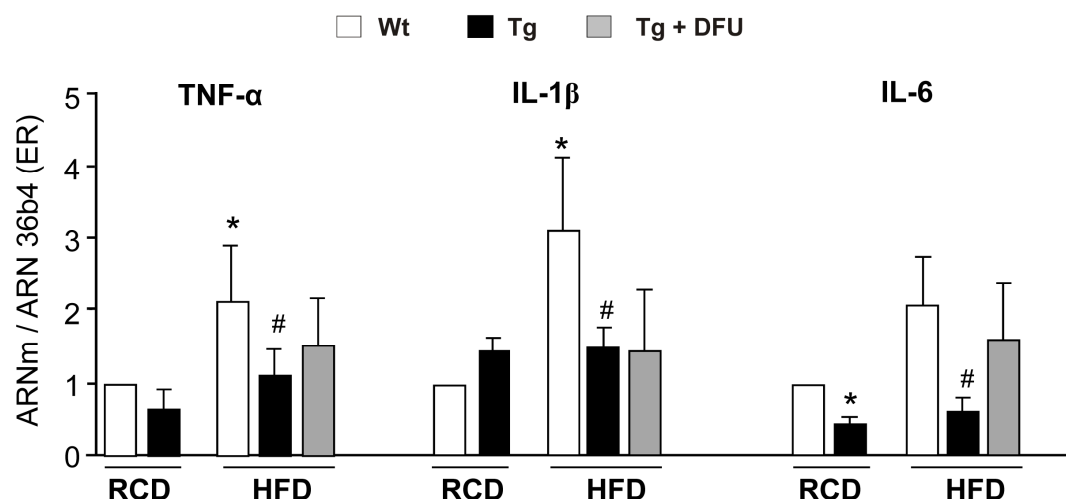


Figura 16. La expresión de COX-2 en el hepatocito reduce los niveles de ARNm de las citoquinas pro-inflamatorias en hígado de ratones Tg. Análisis de los niveles de expresión de ARNm de TNF-α, IL-1β e IL-6 mediante PCR a tiempo real. Los datos se normalizaron frente al ARN 36b4, se relativizaron frente a Wt con una dieta RCD (asignando arbitrariamente el valor 1), y se representan como la media ± error estándar de 4 a 6 ratones de cada grupo experimental. * $p < 0.05$ versus Wt-RCD; # $p < 0.05$ versus Wt-HFD.

Por otro lado, se ha descrito una fuerte asociación entre la inflamación derivada del aumento de tejido adiposo y la resistencia a la insulina (125). Por esta razón, se decidió analizar histológicamente el tejido adiposo eWAT, y los resultados mostraron hipertrofia de los adipocitos en los ratones Wt con respecto a los Tg, similar a la producida después de la inhibición farmacológica de COX-2 en los ratones Tg (Figura 17A). El histograma de frecuencia del área del adipocito con respecto al número de células mostró un desplazamiento hacia la izquierda en el tamaño de los adipocitos en ratones Tg, con un aumento en el número de células y una disminución del área ocupada por los adipocitos (Figura 17B-C).

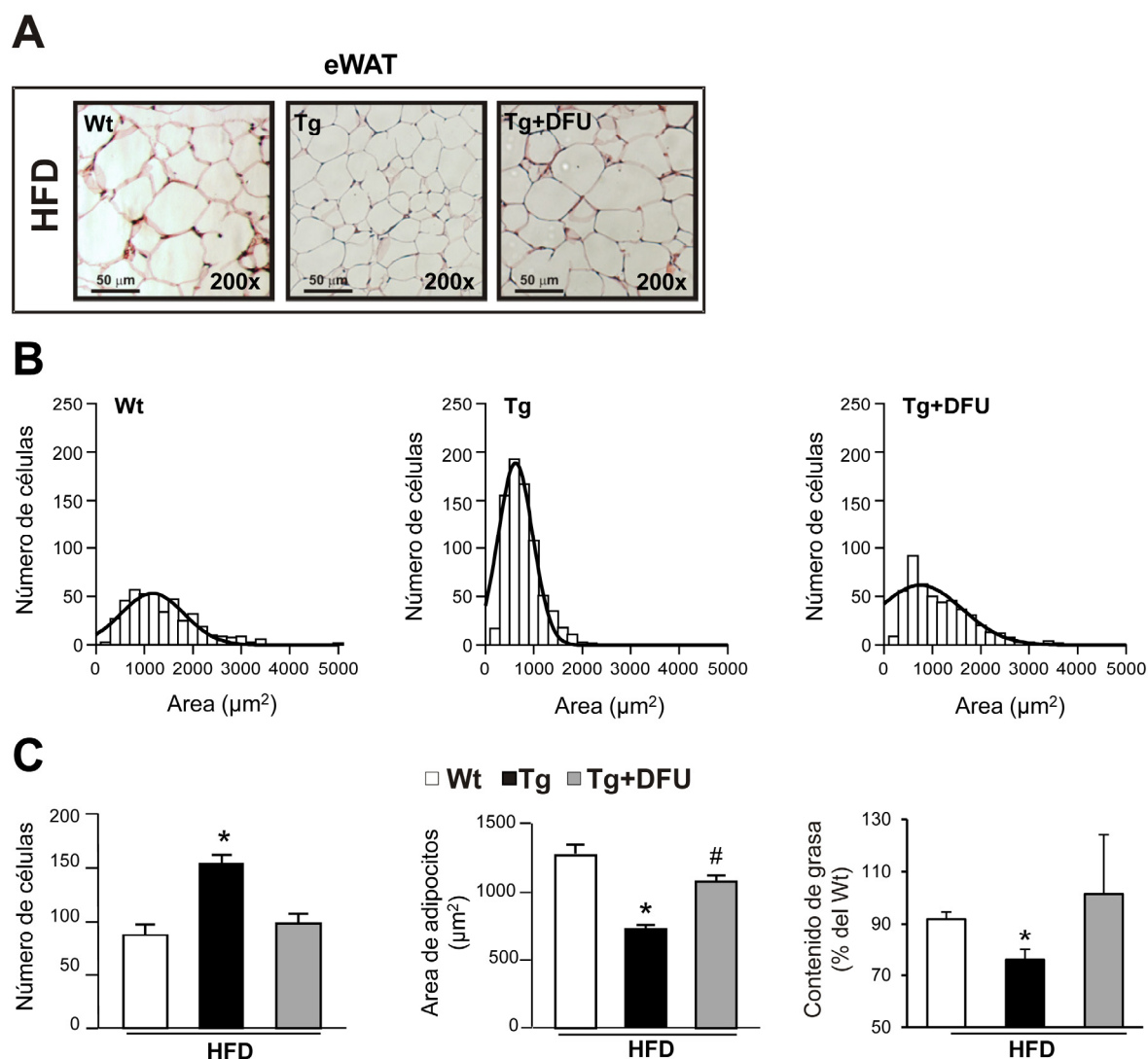


Figura 17. Los ratones Tg presentan menor adiposidad inducida por una dieta HFD. **A)** Imagen representativa de cortes de tejido adiposo eWAT teñido con eosina y hematoxilina de ratones Wt, Tg y Tg tratados con DFU alimentados con una dieta HFD. **B)** Histogramas de frecuencia de eWAT y **C)** Número y área de adipocitos calculados a partir del análisis de 5 cortes por ratón (n=4), y contenido de grasa (eWAT+iWAT) relativo al peso corporal de todos los grupos experimentales tratados con la dieta HFD. Los datos fueron expresados como la media \pm error estándar. * $p < 0.05$ versus Wt-HFD; # $p < 0.05$ versus Tg-HFD.

Además, se determinaron los niveles de expresión de adipocinas y citoquinas proinflamatorias mediante PCR a tiempo real en el tejido adiposo eWAT, y se obtuvieron altos niveles de ARNm de adiponectina y bajos niveles de *TNF- α* e *IL-6* en los ratones Tg tratados con una dieta HFD (Figura 18).

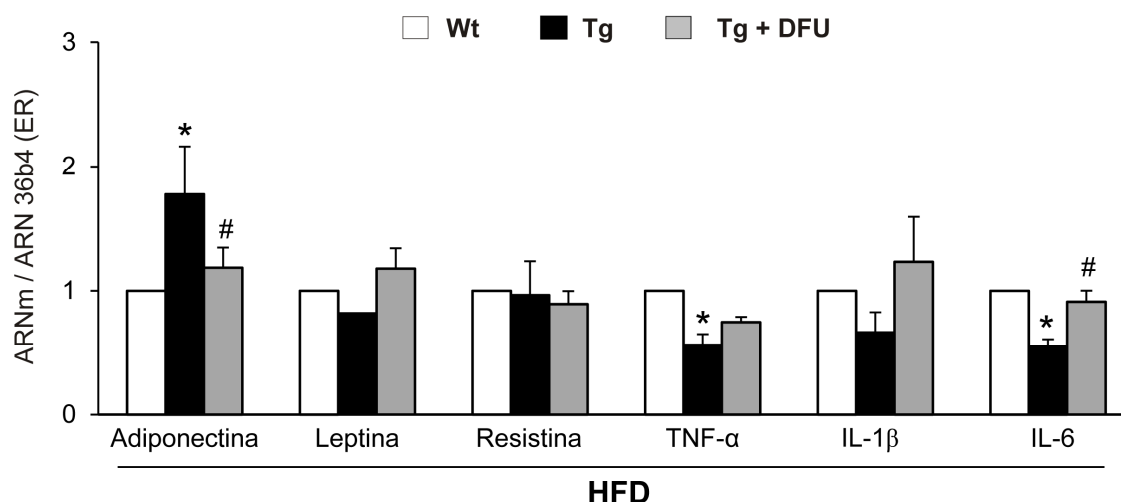


Figura 18. La expresión de COX-2 en el hepatocito modula los niveles génicos de adipocinas y citoquinas en el tejido adiposo eWAT de ratones Tg después de una dieta HFD. Análisis de los niveles de expresión de ARNm de adiponectina, leptina, resistina, TNF- α , IL-1 β e IL-6 mediante PCR a tiempo real. Los datos fueron normalizados al ARN 36b4, relativizados frente a Wt con dieta HFD (asignando arbitrariamente el valor 1), y representados como la media \pm error estándar de 4 a 6 ratones de cada grupo experimental. * $p < 0.05$ versus Wt-HFD; # $p < 0.05$ versus Tg-HFD.

Para determinar cómo las prostaglandinas derivadas de COX-2 producidas en hepatocito podrían proteger frente a la esteatosis, adiposidad, resistencia a insulina, inflamación, etc., se analizaron marcadores bioquímicos y metabólicos en plasma de los ratones después del tratamiento con la dieta HFD. Los resultados mostrados en la Tabla 6, indicaron que los niveles plasmáticos de TG, colesterol y ácidos grasos libres no esterificados (NEFAs) estaban aumentados significativamente tanto en los ratones Wt como los Tg tratados con una dieta HFD con respecto a sus controles RCD, pero bajo la condición HFD, los ratones Tg presentaron niveles atenuados en comparación con los Wt. Además, los niveles de insulina y leptina también se vieron incrementados después de la dieta HFD en ratones Wt, pero estos niveles fueron menores en el caso de los ratones Tg. Por otro lado, los ratones Tg mostraron ser hipoleptinémicos con ambas dietas con respecto a los Wt, y los niveles de adiponectina fueron elevados (20% de incremento) en ratones Tg versus Wt, tras el tratamiento con la dieta HFD. El ratio adiponectina/leptina fue más elevado en los ratones Tg con una dieta HFD, todo lo contrario que el indicador de resistencia a la insulina HOMA-IR. El tratamiento de los ratones Tg con DFU revertió los efectos beneficiosos de las PGE₂ derivadas de COX-2 en relación a los parámetros plasmáticos. De hecho, tal y como se esperaba, los niveles de PGE₂ plasmática estaban aumentados en los ratones Tg y no presentaron cambios al tratar con la dieta HFD. Sin embargo, estos niveles se redujeron en los ratones Tg tratados con DFU.

Tabla 6. Marcadores bioquímicos y metabólicos en ratones Tg después de una dieta HFD. Los niveles de triglicéridos (TG), colesterol, ácidos grasos libres no esterificados (NEFAs), insulina, leptina, adiponectina y PGE₂ se analizaron en ratones Wt y Tg alimentados con una dieta RCD o HFD durante 12 semanas. Los datos se representan como la media \pm error estándar de 4-6 de ratones de cada grupo experimental. * $p < 0.05$ versus Wt-RCD; # $p < 0.05$ vs. Wt-HFD; † $p < 0.05$ vs. Tg-HFD.

| | RCD | | HFD | | |
|----------------------------|------------------|-----------------|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| | Wt | Tg | Wt | Tg | Tg+DFU |
| TG (mg/dl) | 23.8 \pm 2.7 | 23.7 \pm 4.5 | 35.8 \pm 3.1* | 23.3 \pm 1.9 [#] | 32.6 \pm 1.6* [†] |
| Colesterol (mg/dl) | 101.8 \pm 13.0 | 72.7 \pm 10.7 | 232.2 \pm 25.7* | 147.8 \pm 9.1* [#] | 207.9 \pm 15.3* [†] |
| NEFAs (mEq/l) | 18.7 \pm 2.2 | 16.8 \pm 2.8 | 23.4 \pm 3.0* | 14.2 \pm 2.4 [#] | 21.7 \pm 4.4* [†] |
| Insulina (ng/ml) | 0.9 \pm 0.3 | 0.7 \pm 0.2 | 1.7 \pm 0.4* | 1.5 \pm 0.1* | 2.2 \pm 0.7* |
| Adiponectina (pg/ml) | 7.2 \pm 0.7 | 7.0 \pm 1.6 | 6.1 \pm 1.1 | 8.1 \pm 0.4 [#] | 4.9 \pm 0.6* [†] |
| Leptina (pg/ml) | 7.6 \pm 2.1 | 3.8 \pm 0.6* | 24.9 \pm 1.8* | 21.3 \pm 1.5* [#] | 25.0 \pm 0.9* [†] |
| Ratio adiponectina/leptina | 0.95 | 1.83* | 0.24 | 0.4 [#] | 0.2 |
| HOMA-IR (u.a) | | | 19.0 \pm 2.9 | 14.5 \pm 0.9 [#] | 23.4 \pm 0.6 |
| PGE ₂ (pg/ml) | 9.4 \pm 1.2 | 14.2 \pm 1.1* | 9.0 \pm 0.3 | 12.0 \pm 0.5* [#] | 8.0 \pm 0.3 [†] |

También, se midió el daño hepático indirectamente mediante el análisis de la actividad de marcadores como la ALT y AST. Ambas enzimas incrementaron su actividad en ratones sometidos a una dieta HFD con respecto a la dieta control, siendo este incremento menor en los ratones Tg (Figura 19).

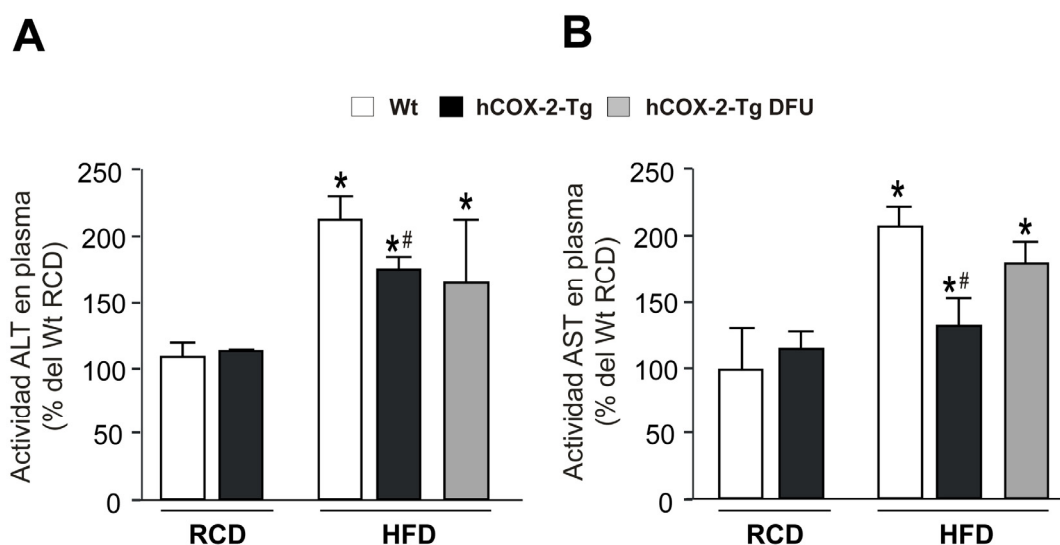


Figura 19. La expresión de COX-2 en el hepatocito protege frente al daño hepático reduciendo los niveles plasmáticos de ALT y AST después de una dieta HFD. Los niveles de la actividad de ALT y AST se analizaron espectrofotométricamente. Los datos se representan como la media \pm error estándar de 4 ratones de cada grupo experimental. * $p < 0.05$ versus Wt-RCD; # $p < 0.05$ vs. Wt-HFD.

Para profundizar en el mecanismo del papel protector de COX-2 en el hígado, se decidió evaluar los niveles de ARNm de los diversos genes implicados en la oxidación de ácidos grasos, en el transporte de lípidos, en la lipogénesis y la lipólisis. En el hígado de los ratones Tg tratados con dieta HFD, se encontró un incremento significativo de *Ppara* y *Cpt1a* indicando una mejora en la oxidación de ácidos grasos. Además, la expresión de genes implicados en la síntesis de ácidos grasos como *Pparg* y *Scd1* fue significativamente mayor en los ratones Wt sometidos a la dieta HFD, viéndose el incremento atenuado en los ratones Tg. Este mismo efecto se observó en los niveles de ARNm del transportador de membrana *Cd36* en los ratones Tg (Tabla 7).

Tabla 7. COX-2 en el hepatocito modula la expresión de genes implicados en lipogénesis, lipólisis, y β -oxidación en ratones Tg después de una dieta HFD. Los niveles de ARNm se determinaron mediante RT-PCR en tiempo real. Los datos están normalizados frente a ARN 36b4, relativizados al Wt-RCD asignando arbitrariamente el valor 1, y se representan como la media \pm error estándar de 4-6 ratones de cada grupo experimental. * $p < 0.05$ versus Wt-RCD; # $p < 0.05$ vs. Wt-HFD.

| Genes | RCD | | HFD | |
|---------------|-----|------------------|------------------|-------------------|
| | Wt | Tg | Wt | Tg |
| <i>Cpt1a</i> | 1 | 1.15 \pm 0.04 | 1.70 \pm 0.20* | 2.87 \pm 0.27*# |
| <i>Pgc1a</i> | 1 | 0.68 \pm 0.22 | 1.00 \pm 0.13 | 0.99 \pm 0.14 |
| <i>Acox1</i> | 1 | 0.73 \pm 0.20 | 1.92 \pm 0.24* | 1.18 \pm 0.39 |
| <i>Ppara</i> | 1 | 1.61 \pm 0.18* | 2.54 \pm 0.10* | 4.41 \pm 0.14*# |
| <i>Pparg</i> | 1 | 0.16 \pm 0.04* | 5.95 \pm 0.09* | 2.94 \pm 0.07*# |
| <i>Acaca</i> | 1 | 0.94 \pm 0.18 | 1.21 \pm 0.36 | 0.89 \pm 0.16 |
| <i>Fasn</i> | 1 | 1.59 \pm 0.43 | 1.32 \pm 0.72 | 1.09 \pm 0.35 |
| <i>Scd1</i> | 1 | 0.64 \pm 0.24 | 2.25 \pm 0.23* | 1.46 \pm 0.09*# |
| <i>Lipc</i> | 1 | 0.87 \pm 0.17 | 1.05 \pm 0.18 | 1.18 \pm 0.16 |
| <i>Lipe</i> | 1 | 0.82 \pm 0.08 | 1.70 \pm 0.06* | 1.80 \pm 0.56 |
| <i>Pnpla2</i> | 1 | 0.97 \pm 0.17 | 1.68 \pm 0.56 | 2.55 \pm 0.53 |
| <i>Cd36</i> | 1 | 0.67 \pm 0.18 | 6.30 \pm 0.38* | 3.65 \pm 0.22*# |

4.1.5. COX-2 modula la termogénesis en ratones tratados con una dieta HFD

Para determinar la causa de la disminución de la adiposidad y de la mejora de la sensibilidad a la insulina producida por la expresión constitutiva de h-COX-2 en el hepatocito después de una dieta HFD, se examinó la ingesta y el gasto energético de los ratones introduciéndolos en jaulas metabólicas durante 48 horas. La reducción de la adiposidad en ratones Tg no se podía explicar por una disminución de la ingesta (Figura 13D), pero se asoció a un incremento del gasto energético (Figura 20A). Aunque no se observaron diferencias entre los genotipos en la actividad locomotora, la temperatura de las jaulas de los ratones Tg fue significativamente mayor con respecto a los Wt, revirtiéndose en los ratones Tg tratados con DFU (Figura 20B-C).

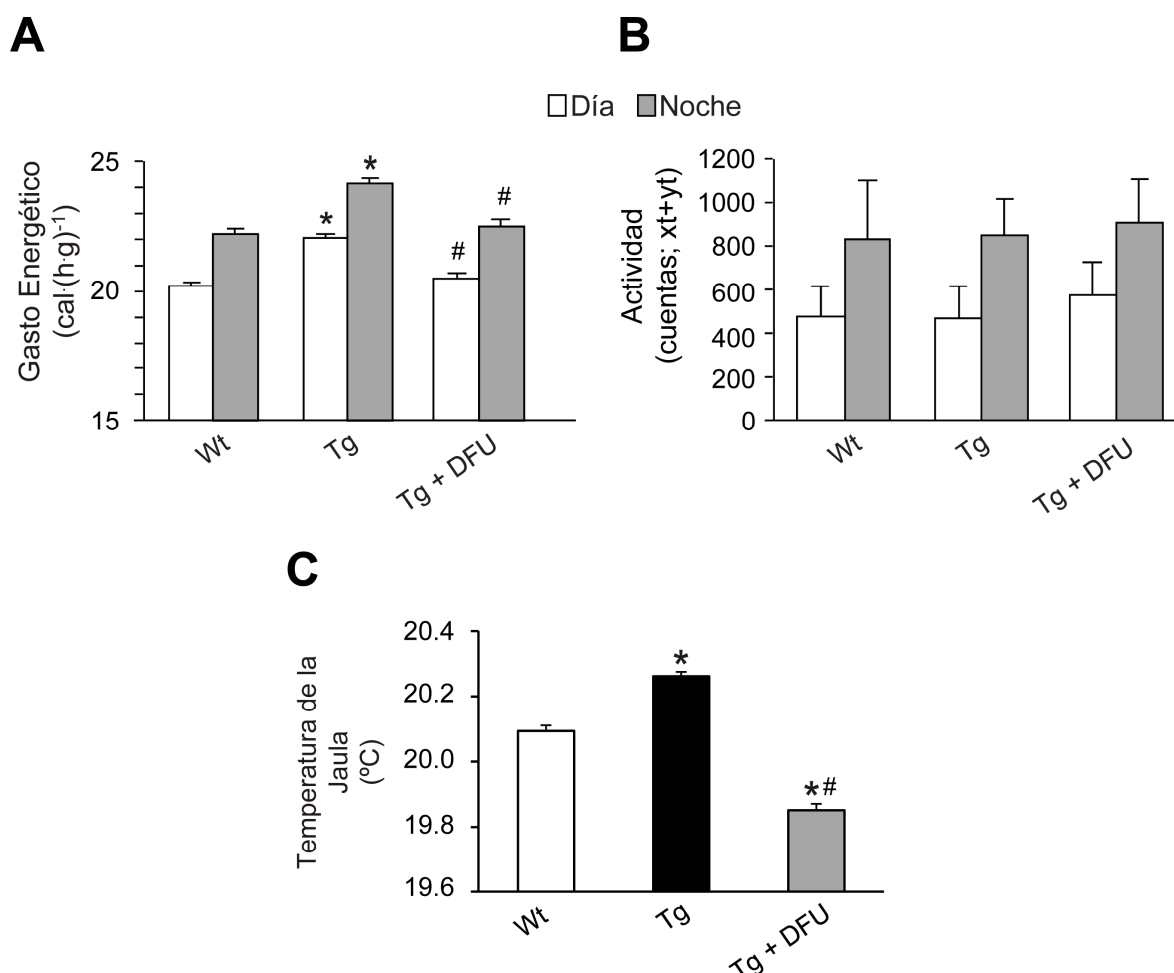


Figura 20. Los ratones Tg presentan un incremento del gasto energético después del tratamiento con una dieta HFD. A) Gasto energético, **B)** actividad locomotora y **C)** temperatura de las jaulas se midieron durante 12 horas de día y de noche en ratones Wt, Tg y Tg tratados con DFU, todos ellos alimentados con dieta HFD. Los datos se representan como la media \pm error estándar de 4-6 de cada grupo experimental. * $p < 0.05$ versus Wt-HFD; # $p < 0.05$ versus Tg-HFD.

En relación con el incremento del gasto energético y de la temperatura de las jaulas, se analizó la expresión de genes implicados en la termogénesis en los ratones sometidos a la dieta HFD. Como muestra la Figura 21A, la PGE₂ derivada de la expresión de COX-2 en el hepatocito aumentó los niveles de ARNm de los genes *Ucp1*, *Dio2* y *Prdm16* en tejido adiposo iWAT, sugiriendo una inducción en la transdiferenciación del tejido adiposo blanco a marrón (*browning*). En este sentido, también se observó un incremento de los genes termogénicos en tejido adiposo BAT de ratones Tg. Para reforzar estos datos y analizar si existía una respuesta termogénica diferencial entre los genotipos, se diseñó un experimento *in vivo* de aclimatación al frío (Figura 21B). La inducción del ARNm de los genes *Ucp1*, *Dio2* y *Prdm16* fue significativamente mayor en tejido iWAT de los ratones Tg sometidos al frío, sugiriendo un proceso de *browning*. En tejido adiposo BAT, solamente hubo un efecto diferencial después de la exposición al frío en el ARNm de *Ucp1* de los ratones Tg. Además, como se observa en la figura 21C, la PGE₂ fue capaz de inducir la expresión génica de *Ucp1* en la línea celular murina de adipocitos marrones inmortalizados no diferenciados (células SVF).

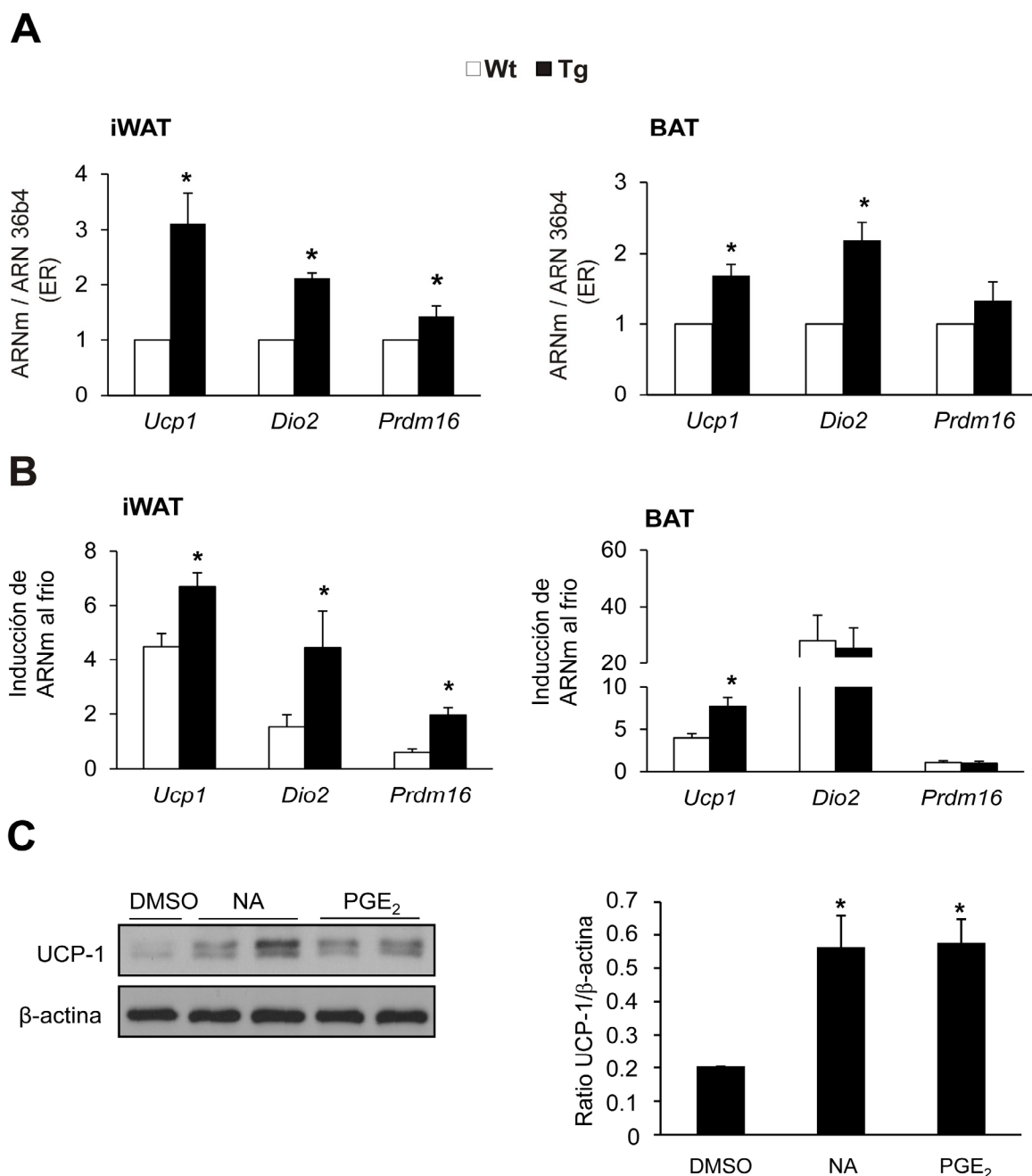


Figura 21. Los ratones Tg muestran una mejora en la actividad termogénica. **A)** Los niveles de ARNm de los genes *Ucp1*, *Dio2* y *Prdm16* se midieron mediante RT-PCR en tiempo real en los tejidos adiposos iWAT y BAT de ratones sometidos a la dieta HFD. Los valores están normalizados frente al ARNm *36b4* y relativizados a Wt-HFD asignando arbitrariamente el valor 1, y se representan como la media \pm error estándar de 4-6 ratones de cada grupo experimental. * $p < 0.05$ versus Wt-HFD. **B)** Los ratones se mantuvieron a 28°C durante 1 semana y luego a 4°C durante 6 horas. Los niveles de ARNm de los genes *Ucp1*, *Dio2* y *Prdm16* se midieron mediante RT-PCR en tiempo real en los tejidos adiposos iWAT y BAT, y se normalizaron frente al ARNm *36b4*. Los resultados son expresados como número de veces que cambia el ARNm (inducción) con respecto a Wt y Tg en condiciones de termoneutralidad. Los datos se representan como la media \pm error estándar 4 a 6 ratones de cada grupo experimental. * $p < 0.05$ versus Wt expuesto al frío. **C)** Las células SVF se estimularon con 1 μ M PGE₂ ó Noradrelanina (NA) como control positivo durante 24 horas, y se analizó la expresión de UCP1 mediante Western Blot. Los datos se representan como la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes * $p < 0.05$ versus control sin estimulación.

4.1.6. COX-2 mejora la señalización de la insulina en hígado de ratones tratados con una dieta HFD

Teniendo en cuenta los resultados previos que mostraron un aumento en la sensibilidad a la insulina por parte de los ratones Tg después de una dieta HFD, se evaluaron los niveles de proteínas moduladoras de la vía de la insulina en el hígado. La fosforilación de AKT y AMPK- α , como moduladores positivos, fue significativamente menor en el hígado de los ratones Wt alimentados con la dieta HFD en comparación de los Tg, con un efecto más pronunciado cuando los ratones fueron inyectados con insulina durante 15 minutos antes del sacrificio (Figura 22A-B). Las diferencias en la señalización de la insulina podrían reflejar la expresión diferencial de moduladores negativos de dicha vía. En este sentido, los niveles proteicos de PTP1B se incrementaron en el hígado de ratones Wt con una dieta HFD comparado con los alimentados con una dieta RCD, mientras que este efecto no se observó en el caso de los ratones Tg.

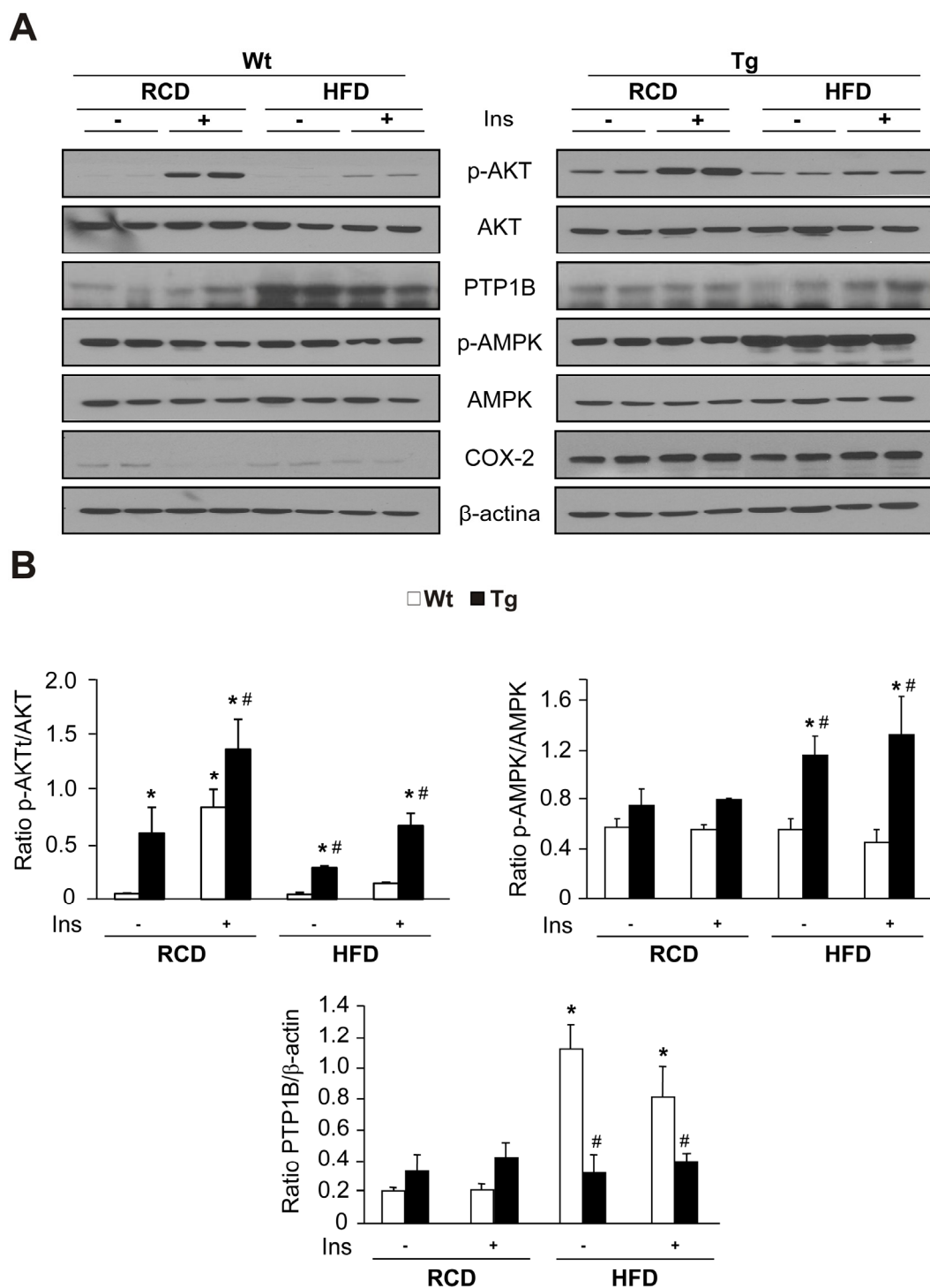


Figura 22. La expresión de COX-2 en el hepatocito mejora la señalización de insulina en el hígado de ratones alimentados con HFD. **A)** Western blot representativos de diversas proteínas implicadas en la vía de señalización de la insulina en el hígado de ratones Wt y Tg sometidos a una dieta RCD o HFD tratados o no con 0,75 U/kg de insulina (Ins) durante 15 minutos antes del sacrificio. **B)** Ratios p-AKT/AKT, p-AMPK/AMPK y PTP1B/ β -actina después del análisis densitométrico de los Western Blot. Los datos están normalizados frente a la β -actina, y se representan como la media \pm error estándar de 4-6 ratones de cada grupo experimental. *, $p < 0.05$ versus Wt-RCD (-Ins); #, $p < 0.05$ versus Wt-HFD (-Ins).

Para profundizar en el mecanismo molecular mediante el cual COX-2 protege frente a la resistencia a la insulina en el hígado, se decidió analizar la regulación de miARNs específicos de hígado por parte de COX-2 y sus implicaciones en la vía de la insulina. Los resultados obtenidos constituyen la segunda parte de esta tesis.

4.2. La expresión constitutiva de COX-2 protege frente a la resistencia a la insulina mediante la regulación de un grupo de miARNs en células hepáticas

4.2.1. COX-2 regula la expresión de un grupo específico de miARNs en el hepatocito

Con el fin de identificar los posibles miARNs hepáticos regulados por COX-2, se aisló ARN total proveniente de hígado de ratones Wt y Tg y se diseñó un array de RT²-PCR de miARNs. Teniendo en cuenta únicamente los miARNs que representan un incremento o una disminución de su expresión igual o superior a 2, de los 440 miARNs maduros analizados, sólo 30 de ellos se expresaban diferencialmente en los ratones Tg con respecto a los Wt (Figura 23A). De estos miARNs, 21 de ellos estaban reducidos y 9 aumentados.

Posteriormente, se decidió analizar la implicación de estos miARNs diferencialmente expresados en presencia de COX-2 en las distintas vías de señalización así como los posibles genes diana, usando herramientas bioinformáticas como es la base de datos DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*). Este análisis *in silico* resultó en un enriquecimiento de genes implicados en la vía de señalización de la insulina (datos no mostrados), en consonancia con los resultados previos que mostraron que la COX-2 está implicada en la protección frente a la resistencia a la insulina en el hígado inducida por una dieta rica en grasa. De los 30 miARNs regulados por h-COX-2, solamente 8 de ellos (miR-146b, Let-7b, miR-183, miR-181a1*, miR-23b, miR-184, miR-204, and Let-7^a) tienen como diana a genes implicados en la señalización de la insulina.

El siguiente paso consistió en validar los datos del array mediante RT-PCR en tiempo real en el hígado de los ratones Wt y Tg, y en diferentes modelos celulares como cultivos primarios de hepatocitos y células NCL y CHL. De estos resultados se concluyó que solamente 1 miARNs estaba regulado positivamente (let-7a), mientras que 3 miARNs (miR-23b, miR-146b y miR-183) presentaban una regulación negativa en presencia de COX-2 (Figura 23B-E).

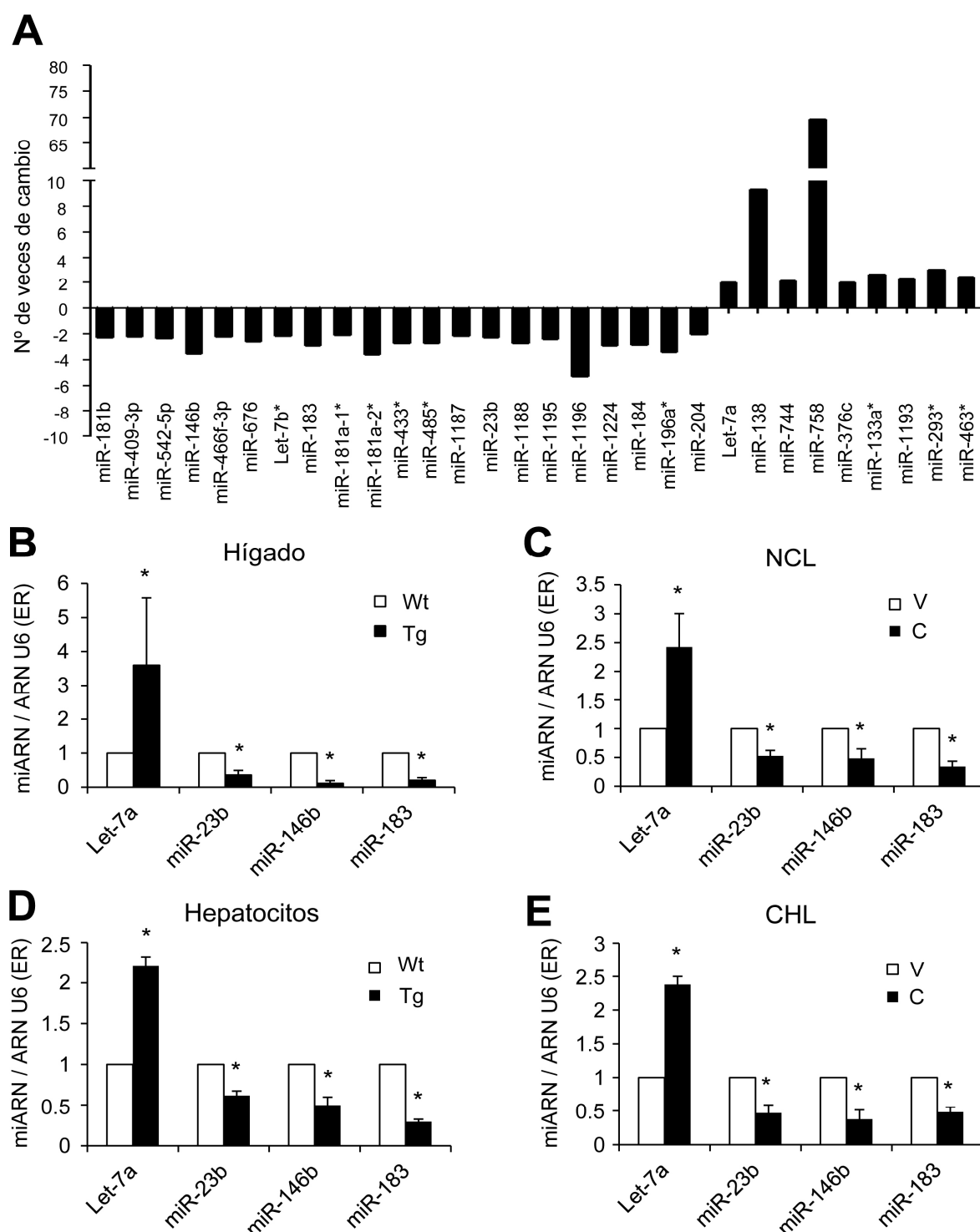


Figura 23. Identificación de miARNs regulados por COX-2 en el hígado. A) Identificación de miARNs expresados diferencialmente en el hígado de ratones Wt y Tg mediante array de qPCR. Los valores se representan como número de veces que cambia un miARN en los ratones Tg con respecto a los Wt. B-E) Validación de la expresión de los miARNs en el hígado de ratones Wt y Tg, en hepatocitos aislados y en células NCL-V/C y CHL-V/C mediante RT-PCR a tiempo real. La expresión de los miARNs está normalizada frente al ARN endógeno U6 y relativizada frente a la ausencia de COX-2 siendo este valor 1 (expresión relativa, ER). Los datos se representan como la media \pm error estándar procedentes de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ versus ausencia de COX-2.

Además, para comprobar la especificidad de COX-2 con respecto a la expresión de los miARNs, las células NCL-V se trataron con PGE₂ y las células NCL-C se transfectaron con ARN de interferencia para h-COX-2 (siCOX-2) para silenciar el transgén. Como se muestra en la Figura 24, la PGE₂ reprodujo los efectos de la sobreexpresión de COX-2 disminuyendo significativamente la expresión de miR-23b, miR-146b y miR-183. Por el contrario, el silenciamiento de COX-2 incrementó los niveles de estos miARNs en las células NCL-C. No se observaron los cambios dependientes de la PGE₂ en los niveles de expresión de let-7a con ninguno de los tratamientos, por lo que se decidió excluirlo de los posteriores análisis.

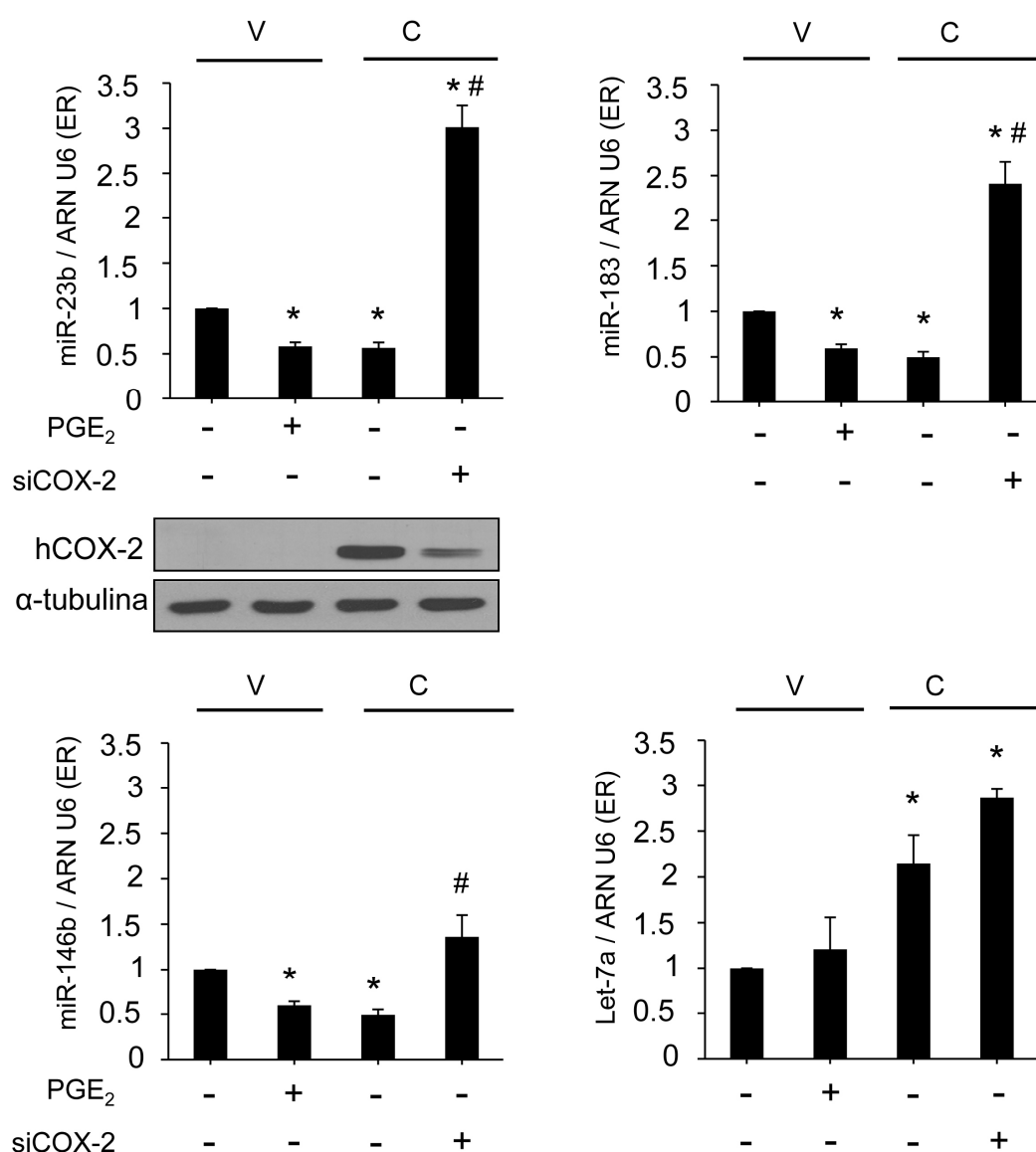


Figura 24. COX-2 regula negativamente miR-23b, miR-146b y miR-183 en las células NCL-C. Las células NCL-V y NCL-C se transfectaron con siRNA control 50 nM (scrambled, Scr) o siCOX-2 50 nM. Al día siguiente, se estimularon con PGE₂ 5 µM. A las 48 horas se extrajo el ARN total y la proteína, y se analizó tanto la expresión de miARN como la de proteína mediante qPCR o WB, respectivamente. Los datos se representan como la media ± error estándar procedentes de 3 experimentos independientes. *p < 0,05 versus NCL-V; #p < 0,05 versus NCL-C.

4.2.2. COX-2 reduce la expresión de miR-23b, miR-146b y miR-183 a través de la acetilación de DDX5 vía PI3K-p300 en células hepáticas

Para profundizar en los mecanismos por los cuales COX-2 podría regular la expresión de este grupo específico de miARNs, se comenzó analizando la expresión de proteínas implicadas en la biogénesis y/o maduración (procesamiento) de los miARNs mediante *Western blot*. Los niveles de DDX5 estaban significativamente más elevados en los hígados de los ratones Tg y en las células NCL-C y CHL-C. Los niveles proteicos de DGCR8, Drosha, DDX17 y Dicer no se modificaron de manera significativa (Figura 25).

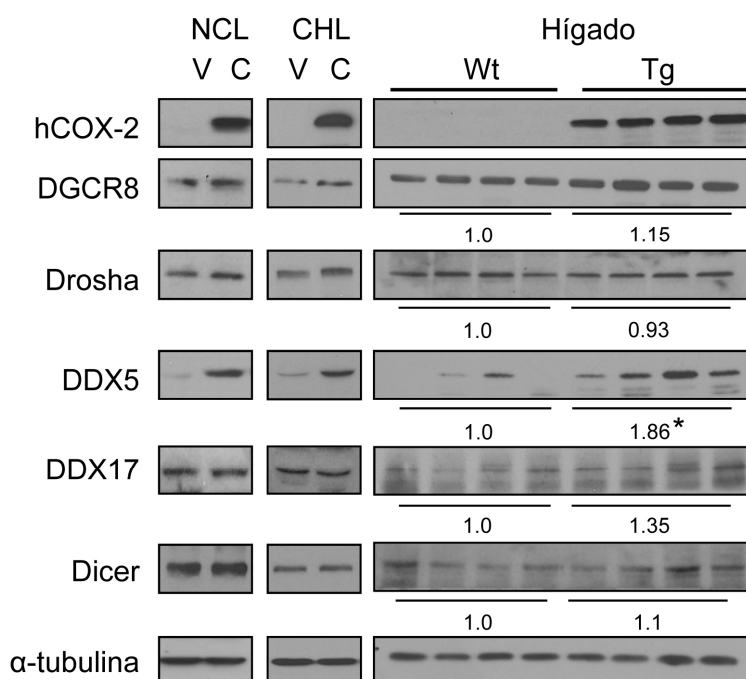


Figura 25. COX-2 incrementa los niveles proteicos de DDX5. WB representativos de la expresión de la COX-2 y de las diversas proteínas implicadas en el procesamiento de los miARNs (DGCR8, Drosha, DDX5 and Dicer). Los extractos celulares se obtuvieron a partir de células NCL y CHL e hígado de ratones Wt y Tg. Se densitometraron los niveles de todas las proteínas, y se relativizó la expresión con respecto al Wt, quedando definida como el valor 1 (expresión relativa, ER). Como control de carga se utilizó α -tubulina. Los datos se representan como la media \pm error estándar procedentes de 8 ratones de cada genotipo. * $p < 0,05$ versus Wt.

Para establecer una relación más directa entre COX-2 y DDX5, se decidió analizar los niveles de expresión de la proteína DDX5 después del tratamiento con PGE_2 en las células NCL-V y silenciamiento de COX-2 en las células NLC-C. El tratamiento con PGE_2 incremento de manera significativa DDX-5, sin embargo ocurrió un efecto inverso con el siCOX-2 (Figura 26A). No se observaron cambios en las otras proteínas implicadas en el procesamiento de los miARNs (Drosha y DGCR8) tras los diferentes tratamientos.

También analizamos si DDX5 era responsable de la disminución de miR-23b, miR-146b y miR-183. Las células NCL-V se transfectaron con el plásmido pcDNA 3.1-DDX5, y los resultados mostraron que la sobreexpresión de DDX5 atenuó significativamente los niveles de estos miARNs (Figura 26B). Cuando las células NCL-C se silenciaron con siDDX5, se revertió el efecto sobre la expresión de los miARNs.

Además, para estudiar si la regulación de los miARNs por parte de COX-2 era a nivel transcripcional (ARN polimerasa II y III), las células NCL-C fueron transfectadas con el siCOX-2 y se determinaron los niveles de los precursores (pri y pre) de los miARN mediante RT-PCR en tiempo real. Como se observa en la Figura 26C, los niveles de los pre-miARN disminuyeron significativamente en presencia de COX-2. Este efecto se revertió tras el silenciamiento de COX-2. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en los niveles de los pri-miARNs, sugiriendo que la regulación de los miARNs por COX-2 es postranscripcional.

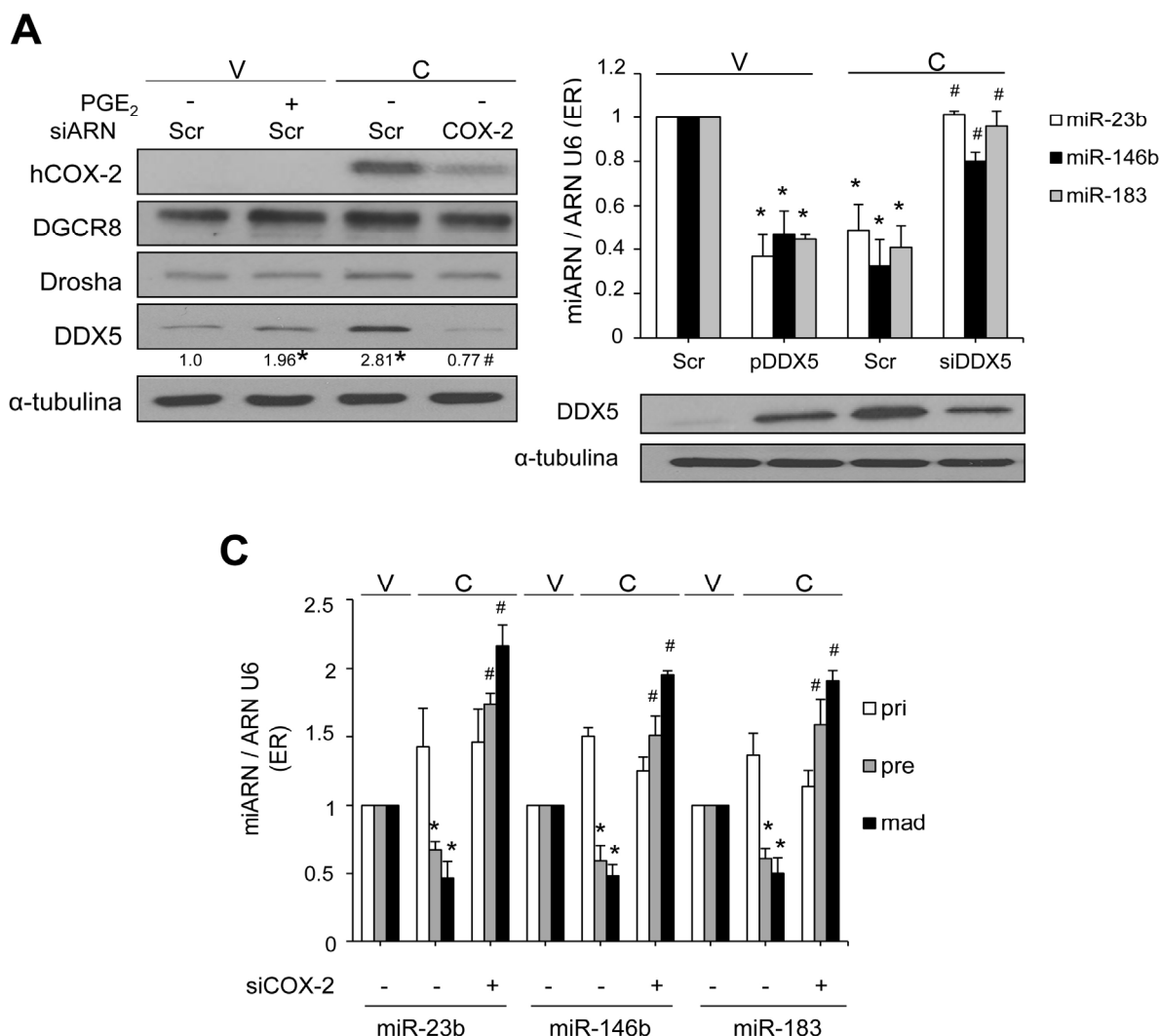


Figura 26. Implicación de DDX5 en la regulación postranscripcional de miARNs por COX-2. **A)** Análisis de los niveles de proteína mediante Western Blot después de la transfección con siARN control (scrambled, Scr) o siCOX-2 50 nM o de la estimulación con PGE₂ 5 μM durante 48 horas. La expresión de proteína se normaliza frente a α-tubulina y se representa relativizado frente a NCL-V siendo su valor 1 (expresión relativa, ER). **B)** Análisis de la expresión de DDX5 mediante WB y de los niveles expresión de las formas primarias (pri), precursoras (pre) y maduras (mad) de los miARNs mediante RT-PCR en tiempo real después de la transfección con siRNA control Scr (-) 50 nM ó siDDX5 30 nM en células NCL-V y NCL-C. Los niveles de pri- y pre-miARNs se normalizaron frente al ARN 36b4, y los niveles de miARN maduro se normalizaron frente al ARN U6. Los datos se representan relativizados frente a NCL-V, como la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *, p < 0,05 frente NCL-V; #, p < 0,05 frente NCL-C. **C)** Análisis de la expresión de los miARNs mediante RT-qPCR en tiempo real. Los niveles de expresión se determinaron normalizando y relativizando frente a ARN endógeno U6 y a las células NCL-V (asignando arbitrariamente el valor de 1), respectivamente. Los datos se representan como la media ± error estándar de 3 experimentos independientes. *, p < 0.05 versus NCL-V y #, p < 0.05 versus NCL-C.

A continuación, determinamos las posibles vías de señalización implicadas en la regulación del procesamiento de los miARN por parte de COX-2. Para este propósito, las células NCL-C se trataron con inhibidores farmacológicos de la vía de p38 (MAPK) (BRIB796), ERK (MAPK) (PD98059), PI3K (LY294002) y PKC (GO6983). Como se observa en la Figura 27A, solamente la inhibición de PI3K con LY294002 disminuyó los niveles proteicos de DDX5. Además el tratamiento de las células NCL-C con LY294002 también incremento los niveles de miR-23b, miR-146b y miR-183 (Figura 27B).

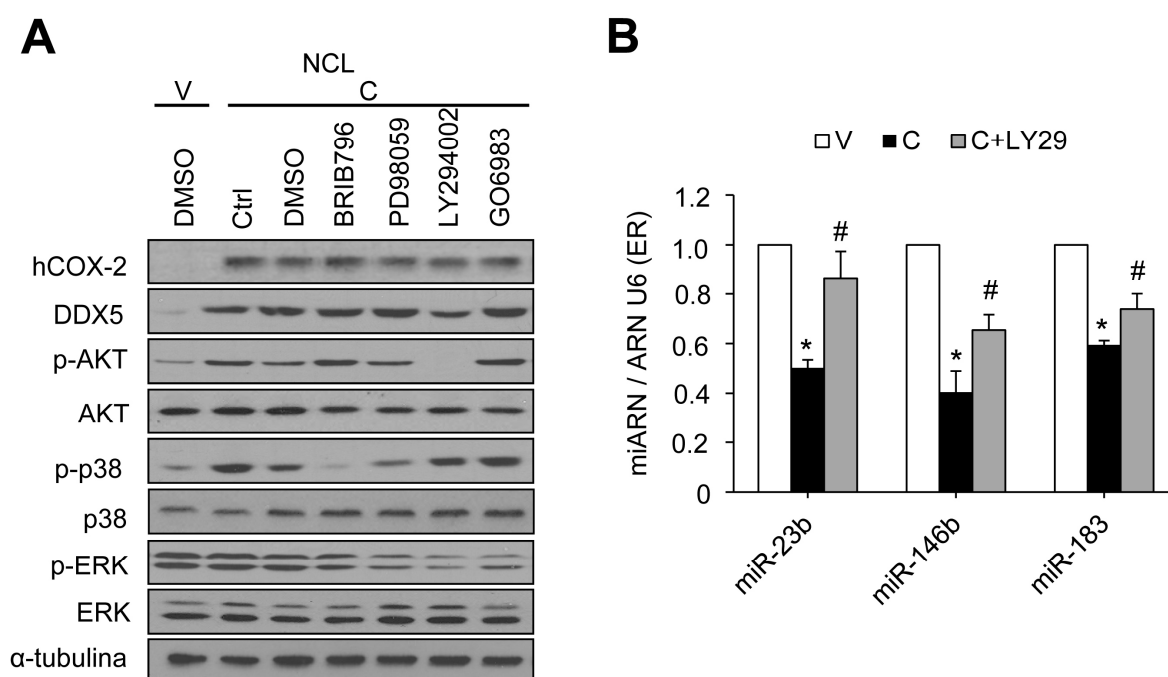


Figura 27. COX-2 incrementa los niveles de DDX5 a través de la vía de PI3K A) Western blot representativo utilizando inhibidores farmacológicos de las diferentes vías de señalización. Las células se mantuvieron sin FBS como paso previo al tratamiento durante 6 horas con los inhibidores BRIB796 0,5 μ M, PD98059 50 μ M, LY294002 20 μ M y GO6983 1 μ M durante 12 horas, y se analizó la expresión de proteína mediante WB. Ctrl (control), y DMSO (dimetilsulfoxido). B) Análisis de la expresión de miARN mediante RT-PCR a tiempo real después del tratamiento con LY294002 20 μ M (LY29) durante 12 horas. Los niveles de expresión se normalizaron frente a las células NCL-V (asignando arbitrariamente el valor de 1), y se representan como media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ versus NCL-V; # $p < 0,05$ versus NCL-C.

En consonancia con estos resultados, una trabajo previo demostró que la expresión constitutiva de hCOX-2 producía activación de la vía PI3K-Akt *in vivo* (40). Además, nosotros medimos la actividad de PI3K *in vitro* con un ensayo ELISA (Millipore catalogo 17-493), y observamos que la actividad de PI3K estaba incrementada significativamente en las células NCL-V tratadas con PGE₂, y en las células NLC-C como era de esperar, el tratamiento con LY294002 redujo la actividad de PI3K (datos no mostrados).

Una vez determinada la relación de COX-2 con PI3K-AKT en nuestro modelo, decidimos estudiar el mecanismo por el cual PI3K-AKT podría regular DDX5. Se había demostrado previamente que AKT fosforilaba a p300, aumentando su actividad acetiltransferasa (64), y que DDX5 se acetila por p300, estabilizando su expresión (101). Como se observa en la Figura 28A, confirmamos el estado acetilado de DDX5 inmunoprecipitando con un anticuerpo anti-Acetil-Lisina, y al silenciar la expresión de COX-2, se redujo la acetilación de DDX5. También, se confirmó que la expresión de DDX5 disminuía al tratar las células NCL-C con C646, un inhibidor específico de la actividad de p300 (Figura 28B).

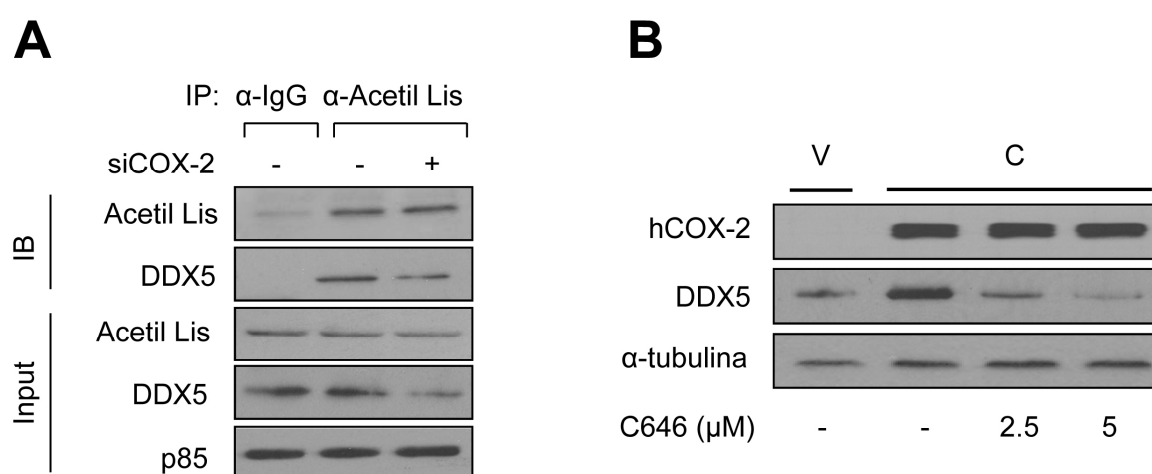


Figura 28. COX-2 estabiliza la expresión de DDX5 a través de la aciltransferasa p300. A) Inmunoprecipitación representativa de 3 experimentos independientes. Las células NCL-C se transfectaron con siCOX-2 (50nM) y se inmunoprecipitaron con anticuerpo contra acetil lisina, seguido de inmunoblot (IB) con anticuerpo anti-DDX5. El panel Input muestra la cantidad de DDX5 en el extracto proteico total. Como control de carga se utilizó p85. (B) Western Blot representativo de 3 experimentos independientes. Las células se trataron con o sin C646 2,5 μM y 5 μM durante 24 horas y la expresión de DDX5 y COX-2 se determinó mediante Western Blot. Como control de carga se utilizó la α-tubulina.

4.2.3. COX-2 se une a Drosha a través de DDX5 modulando su actividad enzimática en células hepáticas

Para determinar si COX-2 regulaba la función enzimática de Drosha mediante la unión física a través de DDX5, se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-COX-2 en las células NCL-C, y se analizaron la presencia de Drosha y DDX5 en este complejo mediante Western Blot. Los resultados indicaron que las proteínas endógenas DDX5 y Drosha coimmunoprecipitaban con COX-2 en las células NCL-C (Figura 29). En este sentido, para estudiar si la unión de COX-2 a Drosha era dependiente de DDX5, se silenció DDX5 y se inmunoprecipitó con el

anticuerpo contra Drosha. Como se muestra en la Figura 29, la inhibición de DDX5 redujo los niveles de COX-2 en el inmunoprecitado, indicando que COX-2 interactúa con el complejo Drosha vía DDX5.

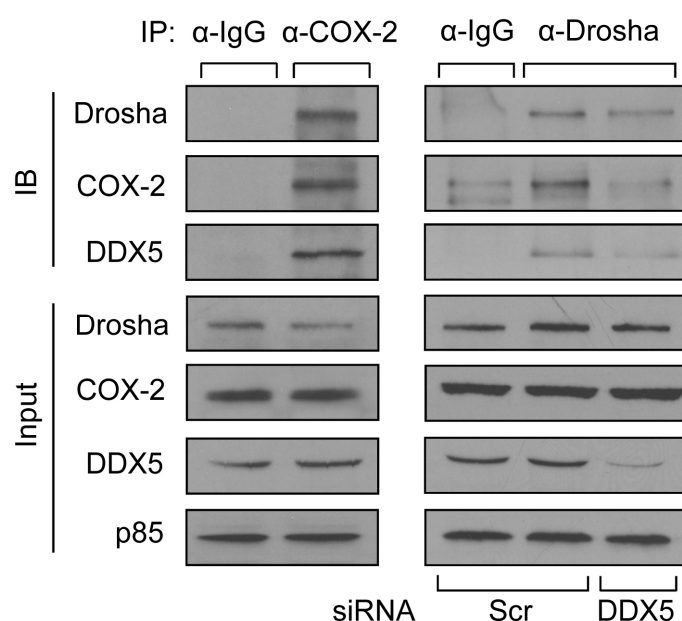


Figura 29. COX-2 interacciona con el complejo de Drosha a través de DDX5. Las células NCL-C se transfectaron con el siARN control (Scr) o con siDDX5 30 nM, y posteriormente se inmunoprecipitó con anticuerpo anti-Drosha o anti-COX-2, seguido de inmunoblot (IB). El panel Input muestra la expresión de proteínas en el extracto proteico total. Como control de carga se utilizó p85.

4.2.4. Relación entre los miARNs regulados por COX-2 y la vía de señalización de la insulina

Una vez determinado que la represión de miR-23b, miR-146b y miR-183 por parte de COX-2 se debe por un aumento de los niveles (estabilidad) de la proteína DDX5 a través de PI3K/AKT/p300 y una modulación de la actividad enzimática del complejo Drosha mediante su unión física a través de DDX5, se decidió analizar las consecuencias funcionales de esta regulación.

En primer lugar, teniendo en cuenta los resultados previos que demuestran el papel protector de COX-2 en el hepatocito frente a la esteatosis, obesidad y resistencia a la insulina inducida por una dieta rica en grasa, así como frente a la apoptosis generada por hiperglucemia (40), se identificó mediante la herramienta bioinformática DAVID *database* un enriquecimiento de genes diana de los miARN implicados en la vía de la señalización de la insulina. Para

confirmar estos resultados, se analizó en las células hepáticas mediante qPCR la expresión de diversos genes relacionados con la vía de la insulina. Los resultados indicaron un aumento significativo de diversos genes, incluido IRS1, en las células hepáticas (NCL y CHL) así como en el hígado de ratones que expresan COX-2 (Figura 30).

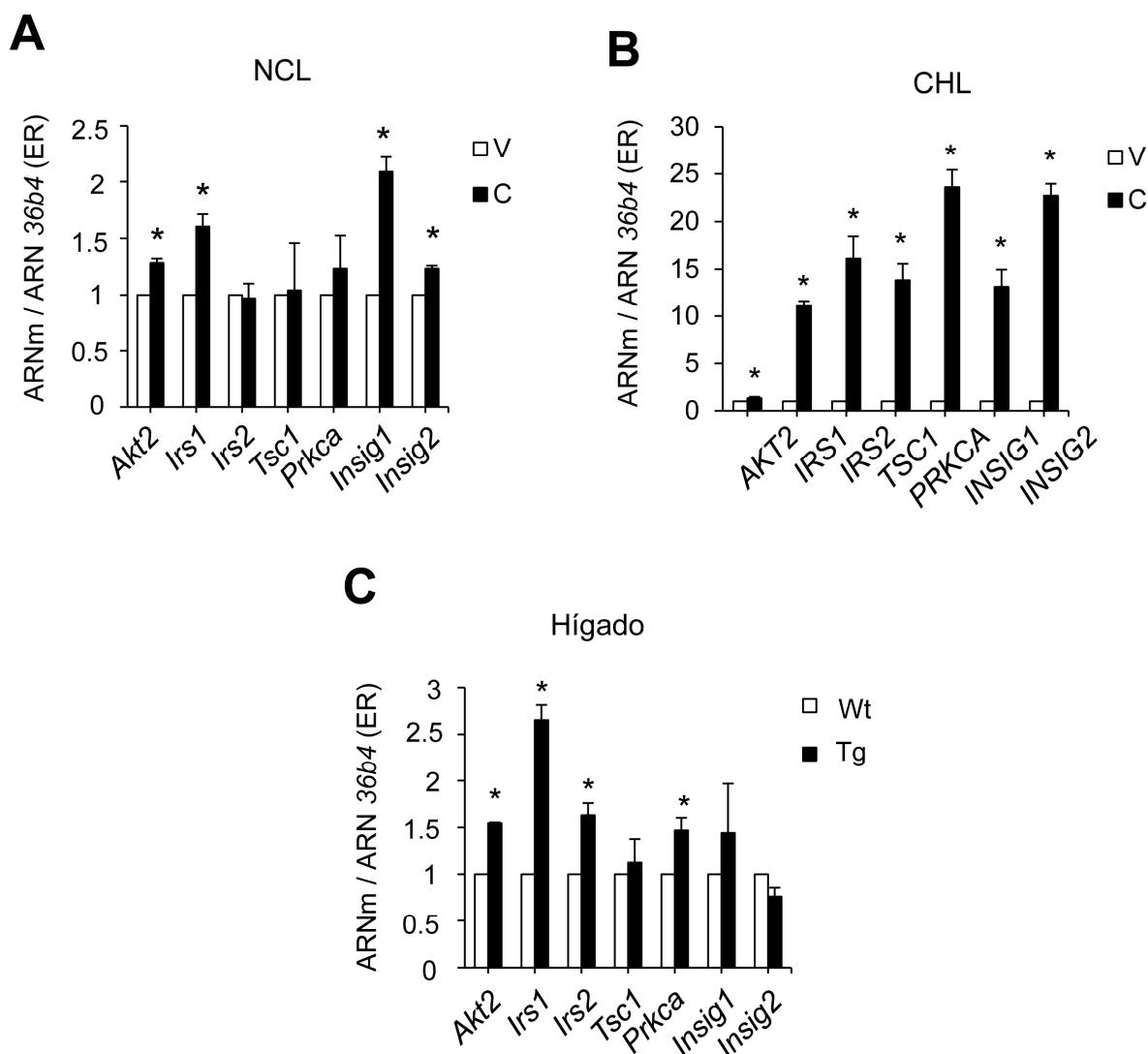


Figura 30. COX-2 induce la expresión de genes diana predictivos de los miARNs relacionados con la señalización de insulina en células hepáticas. Análisis de la expresión de los genes *Akt2*, *Irs1*, *Irs2*, *Tsc1*, *Prkca*, *Insig1* y *Insig2* en células NCL, CHL y extracto de hígado de ratones Wt y Tg. Los datos se normalizaron al gen endógeno 36b4 y relativizaron a NCL-V, CHL-V y Wt. Se realizaron 3 experimentos independientes en el caso de las células, y se utilizaron 8 extractos de hígado de cada genotipo. * $p < 0.05$ versus ausencia de COX-2.

En relación a IRS1, un estudio previo demostró que miR-183 se une directamente a la región 3'UTR de IRS1 murino, inhibiendo su expresión (149). Diversos programas bioinformáticos como RNAhybrid, PITA, y TargetScan, predijeron una asociación de miR-183 con la región

3'UTR en diferentes motivos MRE del ARNm de IRS1, en concreto, se encontró un elemento en la posición 190 (siendo la posición 1 el comienzo de la región 3'UTR). Para confirmar que el miR-183 se unía a la región predictiva descrita con anterioridad, se clonaron en un vector reportero denominado pGL3 las regiones predictivas salvaje (pGL3-Wt) y mutante (pGL3-mut), y se midió la actividad luciferasa en células NCL. Comparado con el control pGL-3-vacío, la actividad luciferasa se redujo significativamente después de co-transfectar con pGL-Wt y miR-183 (Figura 31). No se encontraron diferencias significativas con otras combinaciones, sugiriendo que miR-183 es capaz de unirse específicamente a la región descrita 3'UTR de IRS1, inhibiendo su expresión.

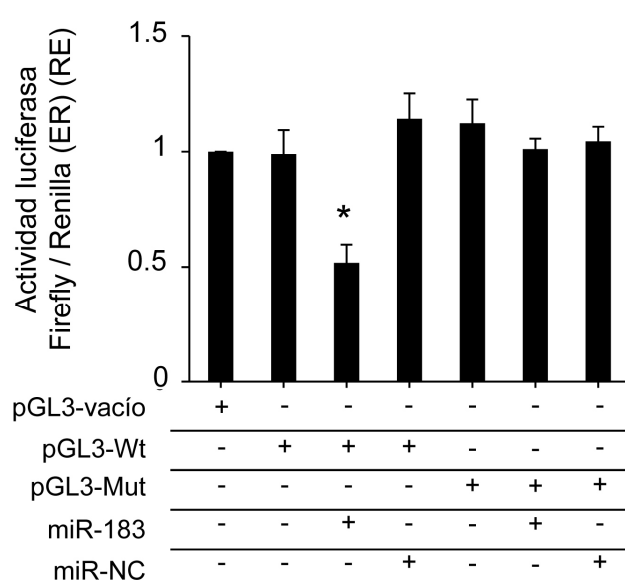


Figura 31. miR-183 se une a la región predictiva del 3'UTR de IRS1. Las células NCL-C se transfectaron con 750 ng de los vectores reporteros pGL3-vacío, salvaje (Wt) y mutante (mut), 50 nM de miR-183 y miR-Control (Ctrl). A las 48 horas, la actividad luciferasa se midió mediante luminiscencia. Los datos se normalizaron frente a la actividad luciferasa de Renilla (todas las muestras están co-transfectados con 50 ng de pRenilla) y relativizados a pGL-3 vacío. Los datos se representan como la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ versus pGL3-vacío.

4.2.5. COX-2 tiene un papel protector en un modelo *in vitro* de resistencia a la insulina inducida por palmitato

Dado los resultados anteriormente descritos, decidimos examinar la vía de la insulina en ratones Tg, NCL-C y CHL-C en condiciones basales. Como muestra la Figura 32, los niveles de proteínas implicados en esta vía como p-IR, IRS1, IRS2 and p-AKT, estaban incrementados en los hígados de los ratones Tg y en las células NCL-C y CHL-C, indicando que la vía de la insulina está activada en presencia de COX-2.

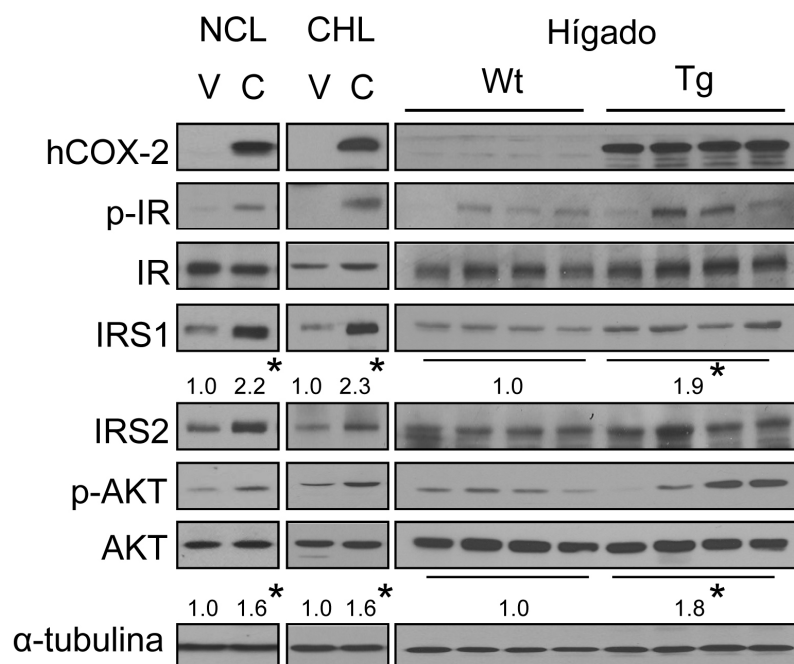


Figura 32. COX-2 incrementa la expresión de proteínas implicadas en la señalización de insulina en células hepáticas. Western Blot representativo de COX-2 y de las proteínas relacionadas con la vía de la insulina en CHL, NCL e hígado de ratones Wt y Tg. El análisis densitométrico de IRS1 y el ratio p-AKT/AKT se normalizó frente a las células NCL-V, CHL-V y Wt asignando arbitrariamente el valor 1. Los datos se representan como la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. En el caso de los animales, se usaron 8 individuos de cada genotipo. * $p < 0.05$ versus NCL-V, CHL-V y ratones Wt.

Para confirmar que tanto COX-2 como DDX5 estaban implicadas en la regulación negativa de los miARNs, y por tanto fueran responsables del incremento en la señalización de insulina en el hígado, se inhibió la expresión de COX-2 y DDX5 con siARNs en células NCL-C. Los resultados indicaron que tanto el silenciamiento de COX-2 y de DDX5 reducían los niveles de proteínas implicadas en la vía de señalización de la insulina en las células NCL-C (Figura 33).

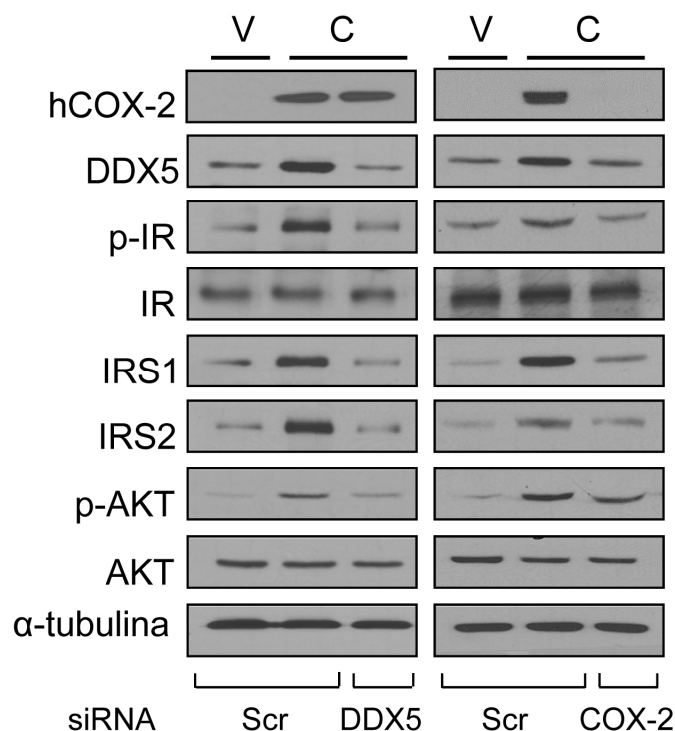


Figura 33. La disrupción de DDX5 y COX-2 disminuye la expresión de proteínas implicadas en la señalización de insulina a través de DDX5 en células NCL. Western blot representativo de 3 experimentos independientes. Las células NCL se transfectaron con siARN control (scrambled, Scr), siDDX5 (30nM) o siCOX-2 50 nM durante 48 horas.

Además, para estudiar si el restablecimiento de los niveles de los miARNs podría revertir el efecto sobre la señalización de insulina en condiciones basales, las células NCL-C fueron transfectadas transitoriamente con los vectores de expresión de miR-23b, miR-146b y miR-183, de manera individual o en combinación. Como se observa en la Figura 34, la expresión ectópica de los miARNs redujo el efecto de COX-2 sobre la activación de la vía de la insulina, siendo más pronunciado cuando se transfectaron en combinación los 3 miARNs.

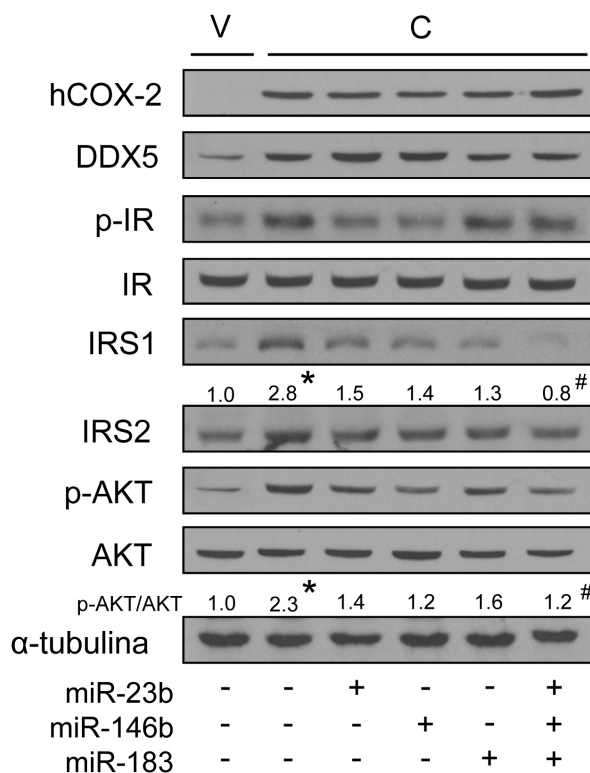


Figura 34. La restauración de los niveles de los miARNs revierte los efectos sobre la señalización de la insulina producida por COX-2 en células NCL. Análisis de las proteínas implicadas en la señalización de la insulina después de la transfección con 4 µg de los vectores de expresión de los miARNs durante 48 horas. El análisis densitométrico se relativizó a las células NCL-V, y definido como 1 (representado como expresión relativa), y se representa como la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$ versus NCL-V; # $p < 0,05$ versus NCL-C.

También, para evaluar si la expresión COX-2 protegía frente a la resistencia a la insulina a través de la regulación de los miARNs, las células NCL-C se transfectaron transitoriamente con el vector de expresión de miR-183, y se estimularon con palmitato (ácido graso inductor de resistencia a insulina) y/o insulina. La expresión de COX-2 en células NCL mostró una menor resistencia a la insulina causada por palmitato respecto a la ausencia de COX-2, mostrada como un aumento de expresión proteica de IRS1 y p-AKT (Figura 35). Sin embargo, la expresión ectópica de miR-183 revertió el efecto protector de COX-2 a la resistencia a la insulina inducida por palmitato, medido por una disminución en los niveles de IRS1 y p-AKT.

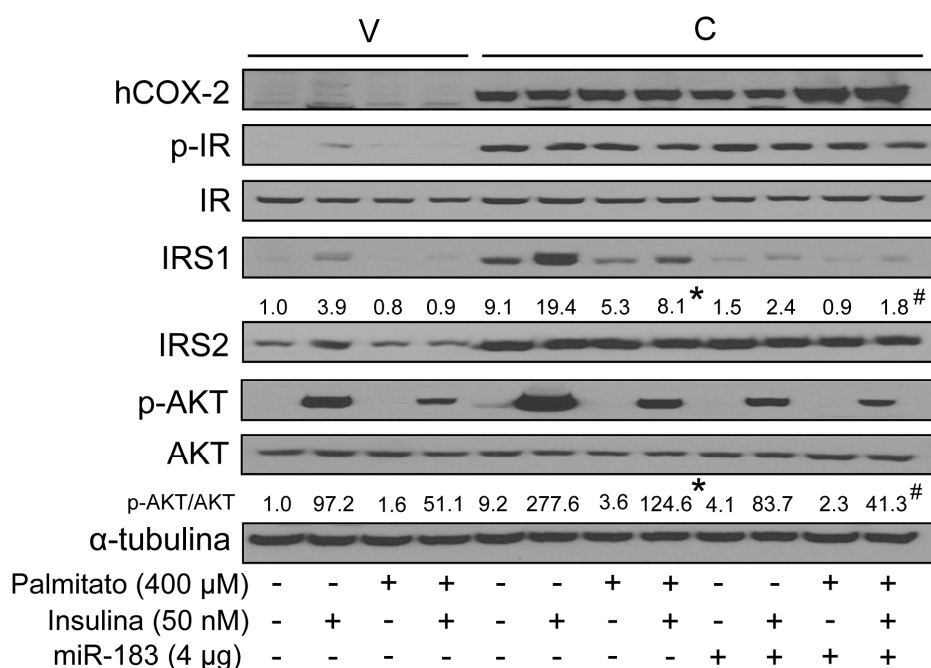


Figura 35. La expresión ectópica de miR-183 contrarresta el efecto protector de COX-2 frente a la resistencia a la insulina generada por el palmitato. Western blot representativo de las proteínas relacionadas con la señalización de la insulina. Las células NCL se transfectaron con el vector de expresión pEGP-miR183, tratadas con 400 μM de palmitato y/o 50 nM de insulina. El análisis densitométrico de IRS1 y el ratio p-AKT/AKT se relativizó frente a NCL-V, asignando arbitrariamente el valor 1. Los datos se representan como la media de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$ versus NCL-V; # $p < 0.05$ versus NCL-C.

4.2.6. Correlación inversa entre la expresión de COX-2 y miR23b, miR-146b y miR-183 en ratones tratados con una dieta HFD

Dado que resultados previos demuestran que COX-2 protege frente a la RI, verificamos la expresión de los miARNs así como la expresión proteica de DDX5 e IRS1 en ratones tratados con una dieta que produce RI (HFD). Como se puede observar en la Figura 36A, la expresión de COX-2 redujo significativamente los niveles de miR-23b, miR-146b y miR-183 en el hígado de ratones Tg en condiciones basales (RCD), viéndose atenuada con el tratamiento con una dieta HFD. Además, en concordancia con los modelos *in vitro* e *in vivo*, la expresión proteica de DDX5 e IRS1 se mantiene aumentada en los ratones Tg tanto en con una dieta RCD como HFD (Figura 36B).

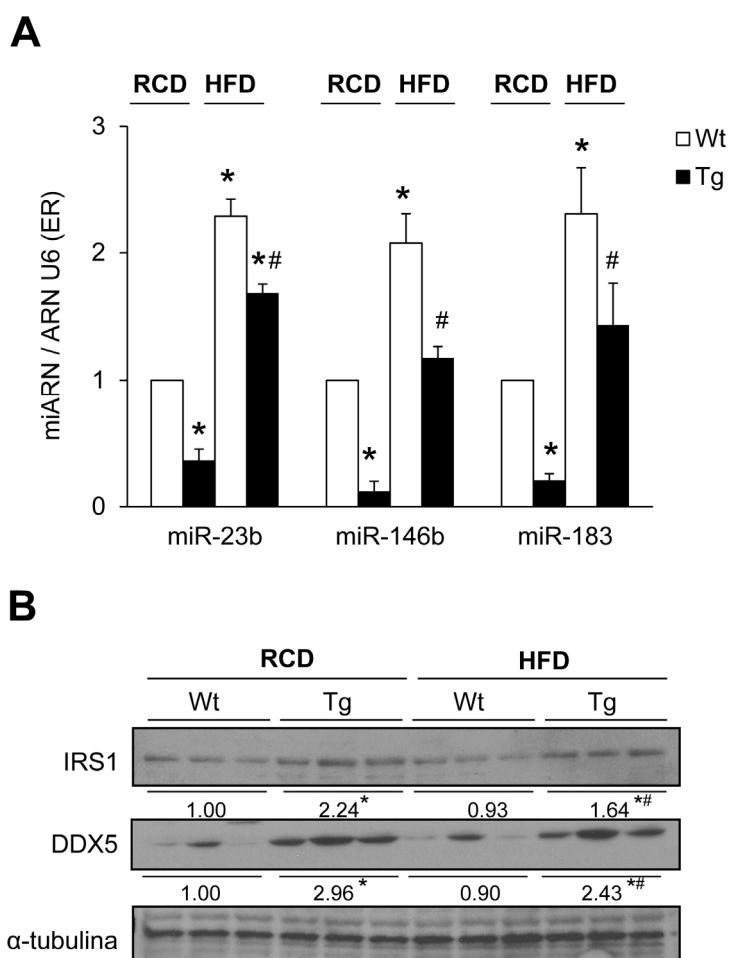


Figura 36. COX-2 correlaciona indirectamente con la expresión de miR-23b, miR-146b y miR-183, y directamente con DDX5 e IRS1 en ratones tratados con HFD. **A)** Análisis de la expresión de miR-23b, miR-146b y miR-183 usando RT-PCR a tiempo real en ratones Wt y Tg tratados con una dieta HFD. Los niveles de expresión de los miARNs se normalizaron frente al ARN U6, y se relativizaron asignando el valor 1 a los ratones Wt-RCD. * $p < 0.05$ versus Wt-RCD; # $p < 0.05$ versus NCL-C. **B)** Análisis de la expresión de IRS1 y DDX5 mediante WB en ratones Wt y Tg tratados con una dieta HFD. Los niveles de expresión se normalizaron frente a α -tubulina, y se relativizaron asignando el valor 1 a los ratones Wt-RCD. * $p < 0.05$ versus Wt-RCD; # $p < 0.05$ versus Wt-HFD.

4.2.7. Correlación inversa entre la expresión de COX-2 y miR-23b, miR146b y miR-183 en pacientes con esteatosis no alcohólica

Dado que COX-2 está implicada en la esteatosis hepática, se decidió examinar si existía una correlación entre la expresión de COX-2 y de los miARNs en pacientes con esteatosis no alcohólica (*non- alcoholic steatosis*, NAS). Como se puede observar en la Figura 37A, la expresión de COX-2 incrementó significativamente en las biopsias hepáticas de los pacientes con NAS frente a la de los pacientes sanos (*normal liver*, NL), mientras que la expresión de

los miARNs disminuyó significativamente. Además, al igual que COX-2, la expresión de DDX5 e IRS1 también estaban incrementadas en pacientes con NAS (Figura 37B).

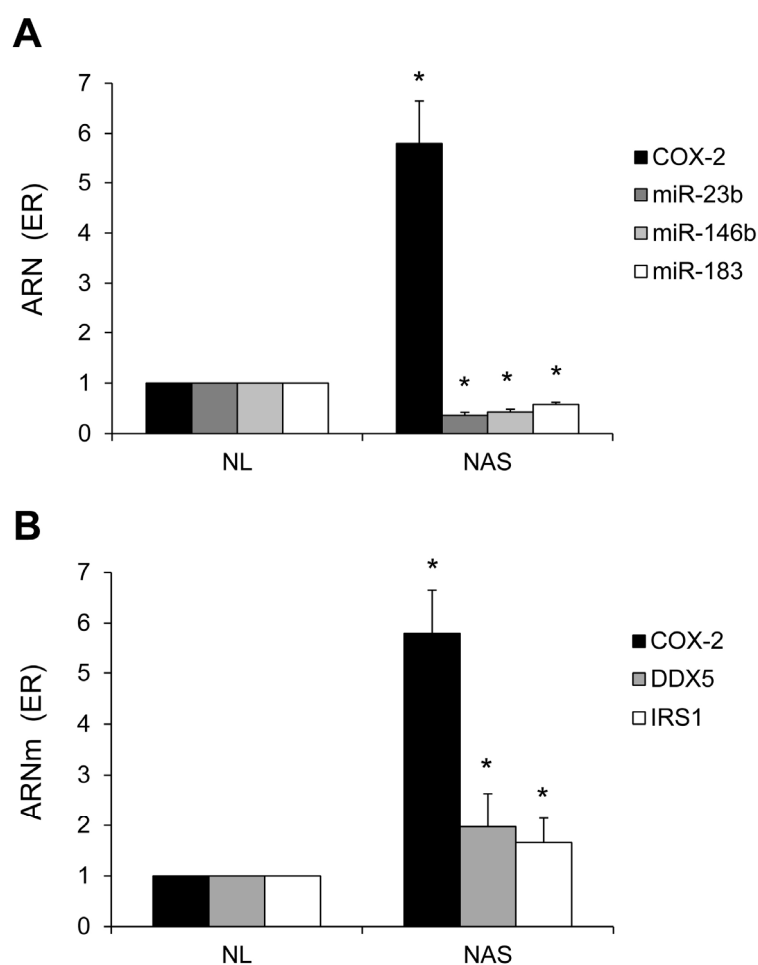


Figura 37. COX-2 correlaciona indirectamente con la expresión de miR-23b, miR-146b y miR-183, y directamente con DDX5 e IRS1 en pacientes con NAS. A-B) Análisis de la expresión del ARNm de COX-2, DDX5 e IRS1, y de miR-23b, miR-146b y miR-183 usando RT-PCR a tiempo real en pacientes NL y NAS. Los niveles de expresión de los genes y de los miARNs se normalizaron frente al ARNm 36B4 y ARN U6, respectivamente, y se relativizaron asignando el valor 1 a los pacientes NL. * $p < 0.05$ versus NL.

5. Discusión

Las PGs dependientes de COX-2 se consideran mediadores pro-inflamatorios que están implicados en la patogénesis de múltiples enfermedades (141). De hecho, en este contexto, la inflamación induce la expresión de COX-2 (126). Además, las células no parenquimales, los hepatocitos fetales con un fenotipo menos diferenciado que los hepatocitos adultos, y algunas líneas celulares hepáticas tienen la capacidad de expresar COX-2; sin embargo, los hepatocitos adultos no expresan COX-2, independientemente de los estímulos utilizados (92). La expresión de COX-2 en el hepatocito adulto se restringe a determinados procesos de des-diferenciación y proliferación en respuesta a una hepatectomía parcial, a un daño hepático agudo y a enfermedades hepáticas crónicas (cirrosis, hepatitis virales, CHC) (91, 93), por lo que la expresión ectópica de COX-2 en los hepatocitos constituye una condición experimental, no fisiológica, ideal para el estudio de la contribución de las PGs derivadas de COX-2 en la patología hepática. En esta tesis, en concreto, hemos investigado la contribución de COX-2 en el desarrollo y progresión de la resistencia a la insulina en enfermedades metabólicas como la EHGNA. Nuestros resultados demuestran que la expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protege frente a la esteatosis hepática, adiposidad, inflamación y resistencia a la insulina en un modelo murino tratado con una dieta HFD. Además, la expresión de COX-2 en células hepáticas protege frente a la resistencia a la insulina regulando negativamente un grupo de miARNs. En conjunto todos estos resultados indican que la ausencia de las PGs derivadas de COX-2 es clave en el desarrollo de la EHGNA.

Se ha estudiado el papel de COX-2 en el contexto de la patogénesis causada por la RI y obesidad con resultados contradictorios. Por un lado, Hsieh y colaboradores demostraron que la sensibilidad a la insulina en tejido muscular y adiposo mejora en ratas alimentadas con dieta rica en grasa o fructosa tras el tratamiento con inhibidores de COX-2 (62, 63, 133). Sin embargo, Coll y colaboradores observaron que el tratamiento con inhibidores de COX-2 exacerbó la inflamación y la RI inducida por palmitato en músculo esquelético (30). En trabajos previos de nuestro grupo, se demostró un papel protector de COX-2 frente a un modelo de lesión hepática por hiperglucemia tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de una disminución en proteínas pro-apoptóticas y un aumento de las vías de supervivencia PI3K/AKT y AMPK (40). En este sentido, el presente estudio revela que los ratones Tg presentan un incremento en la sensibilidad a la insulina tanto en condiciones basales como después del tratamiento con la dieta HFD, protegiendo de la intolerancia a la glucosa, esteatosis y adiposidad. Del mismo modo, trabajos recientes sugieren que la expresión de

COX-2 en tejido adiposo eWAT protege frente a la obesidad mediante un aumento de la actividad termogénica (140), siendo este efecto atribuido principalmente a la producción de PGE₂ derivada de COX-2 (45). En este sentido, la reducción de la adiposidad podría ser explicada como una consecuencia del incremento del gasto energético. Por tanto, la PGE₂ circulante en la sangre derivada de los hepatocitos, sería suficiente para inducir la expresión de genes implicados en la termogénesis (*Ucp1*, *Prdm16*, etc.) en el tejido adiposo, contribuyendo así a la protección frente a la adiposidad. Demostramos esta hipótesis en nuestro modelo, observando un aumento en los niveles de genes termogénicos en tejido adiposo iWAT y BAT en los ratones Tg tras el tratamiento con la dieta HFD o después de exponer a los ratones a bajas temperaturas. También se produjo una inducción de la proteína UCP-1 en pre-adipocitos marrones tratados con PGE₂.

Se ha relacionado la esteatosis en humanos con la inflamación del tejido adiposo y con la resistencia a la insulina periférica (hígado y músculo esquelético) debido a un incremento de ácidos grasos libres y de adipocinas secretadas por el tejido adiposo WAT (12, 106), asociados generalmente con un aumento de tamaño del tejido adiposo (112). Además, la inflamación en el tejido adiposo y otros tejidos, es provocada en parte por la infiltración y activación de las células del sistema inmune, principalmente de macrófagos que son capaces de producir citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , Il-1 β e Il-6 (28, 71). Nuestros resultados muestran que los ratones Tg tratados con la dieta HFD no desarrollan un aumento en la masa de tejido adiposo y presentan una reducción de la hipertrofia adipocitaria, comparado con los ratones Wt sometidos a la misma dieta. En consonancia con estos datos, los niveles plasmáticos y hepáticos de TGs, colesterol y NEFAs están disminuidos en los ratones Tg, así como los niveles plasmáticos de insulina y leptina. Por el contrario, los niveles plasmáticos de adiponectina están incrementados. Además, la expresión de genes pro-inflamatorios (TNF- α , Il-1 β e Il-6) está reducida en el tejido hepático y adiposo de los ratones Tg, comparado con los ratones Wt, después de la dieta HFD. Teniendo en cuenta estos datos, el efecto beneficioso de las PGE₂ derivadas de COX-2 en la obesidad y RI en los ratones Tg es debido, en parte, a la disminución de la inflamación.

Por otro lado, los ratones Tg están protegidos frente a la esteatosis hepática y RI, comparado con los ratones Wt. Además, encontramos diferencias significativas en la expresión génica de enzimas y factores de transcripción claves en el metabolismo de lípidos (*Pparg*, *Scd1*, *Ppara*, *Cpt1a*), así como en proteínas relacionadas con el transporte de ácidos grasos (*Cd36*),

sugiriendo que la protección ejercida por COX-2 se debe parcialmente a un incremento en la β -oxidación. Un trabajo reciente relaciona la sobreexpresión de Cd36 con la RI y esteatosis en pacientes con NASH y hepatitis por VHC (100). En el contexto de la β -oxidación, el efecto beneficioso de COX-2 en la inflamación y RI es producido por la prevención de la obesidad, a través de un incremento del gasto energético.

Las proteínas PI3K y AMPK juegan un papel fundamental en diversas vías implicadas en la supervivencia celular. Además, las fosforilaciones de IRS1 y de AKT son críticas en la señalización mediada por la insulina (134). Se ha descrito que la vía PI3K/AKT es una diana de las PGs y que la fosforilación de AKT es mayor en el hígado de ratones Tg comparado con los ratones Wt, reforzando la idea de un aumento en la supervivencia (40). De hecho, los ratones Tg alimentados con una dieta HFD presentaron una mayor fosforilación de AKT, siendo mayor incluso después de la estimulación con insulina. El incremento de la fosforilación de AKT podría deberse a una activación directa de AKT a través de la unión de la PGE₂ derivada de COX-2 a los receptores EP2/EP4, como describe Rizzo (115). Por tanto, el aumento en la sensibilidad a la insulina dada por la activación de AKT en los hepatocitos de los ratones Tg contribuye a una mejora de los efectos metabólicos producidos en la EHGNA.

En relación a AMPK, se sabe que protege frente a la obesidad y la RI generada por una dieta HFD. La disrupción de AMPK en ratones provoca la acumulación de lípidos en el tejido adiposo, exacerba la respuesta inflamatoria e induce RI (159). Resultados previos del laboratorio muestran una mayor fosforilación de AMPK en células hepáticas que expresan COX-2, tanto en condiciones basales como después del daño hepático (94). También, se ha demostrado que la unión de adiponectina a su receptor conduce a un aumento de AMPK, induciendo la expresión del gen *Cpt1a*, que regula el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial. Además, AMPK induce la expresión del gen *Ppara* que a su vez regula positivamente a *Cpt1a*, modulando ambos la β -oxidación (80, 153). De acuerdo con estos resultados, los ratones Tg presentan un incremento en los niveles génicos de *Cpt1a* y *Ppara* en el hígado, en comparación con los ratones Wt.

Además de la adiponectina, otra adipoquina que activa a AMPK en tejido hepático y muscular, entre otros, es la leptina (99). La síntesis de leptina en el tejido adiposo puede ser estimulada por las acción de las PGs, reduciendo la RI a través de la vía IRS1/PI3K (152). Sin embargo, los ratones Tg presentaron niveles menores de leptina en suero y tejido

adiposo, probablemente dado que la reducción de los niveles de leptina es proporcional a la pérdida de masa de tejido adiposo (112). El contenido lipídico en una célula es determinado por el balance entre la β -oxidación y el almacenaje de lípidos en forma de TGs. En este contexto, es sabido que AMPK posee la capacidad de inducir la oxidación de lípidos favoreciendo una mayor sensibilidad a la insulina (151), esto podría explicar el efecto beneficioso de la expresión de COX-2 sobre la sensibilidad a la insulina en hepatocito, al activar AMPK.

Además de los mecanismos moleculares mencionados con anterioridad, las diferencias en la señalización de la insulina entre los ratones Wt y Tg después de la dieta HFD podría ser reflejo de la expresión diferencial de moduladores negativos implicados en el inicio de la ruta de señalización de la insulina. Entre ellos, PTP1B cuya expresión es inducida por agentes inflamatorios, y que es capaz de desfosforilar directamente a IR, perdiendo su capacidad sensibilizante (157). Se ha descrito que la disrupción de PTP1B en ratones protege contra la inflamación y la RI asociada a la obesidad durante el envejecimiento (51). En consonancia con estos datos, nuestros resultados indican que PTP1B está regulada positivamente en el hígado de ratones Wt alimentados con la dieta HFD, pero no en los ratones Tg, sugiriendo que la PGE₂ dependiente de COX-2 protege frente a la obesidad y RI inhibiendo la expresión de PTP1B.

Por otro lado, Henkel y colaboradores han demostrado que la PGE₂ procedente de las células de Kupffer inhibe la vía de la insulina en hepatocitos a través de la fosforilación en serina del IRS1 vía activación EP3/ERK. Además, indican que este receptor está altamente expresado en los hepatocitos, comparado con las otras isoformas (59). Sin embargo, nuestros resultados muestran que los ratones Wt y Tg presentan niveles similares de todos los receptores EPs (datos no mostrados), indicando un mecanismo molecular diferente. En este sentido, la PGE₂, a través del receptor EP2/4, converge con la señalización de la insulina en la activación de PI3K/AKT (35). Nuestros resultados muestran que tanto los ratones Tg y las células transgénicas, caracterizados por expresar constitutivamente la PGE₂, presentan una mejora en el señalización de insulina a través de AKT, debido en parte a una reducción de los niveles de PTP1B mostrado en el modelo *in vivo* de HFD. Por lo tanto, hemos demostrado que las PGs sintetizadas por otras células del hígado (Kupffer o HSCs) no son

suficientes para contrarrestar los efectos beneficiosos observados cuando los hepatocitos expresan COX- 2.

En resumen, las PGs derivadas de COX-2 en el hepatocito protegen frente a la obesidad y EHGNA reduciendo: la resistencia a la insulina debido en parte a un aumento de la fosforilación de AKT y AMPK y una disminución de los niveles de PTP1B, la esteatosis a través del aumento de la β -oxidación mitocondrial vía AMPK, y la inflamación mediante la regulación negativa de $\text{TNF}\alpha$, IL-6 y IL-1 β ; la adiposidad por una menor hipertrofia (masa de tejido adiposo). Además, las PGs pueden ejercer un efecto positivo sobre: la termogénesis y diferenciación de BAT a partir de WAT (*browning*) dado parcialmente por un incremento de los niveles de Ucp1, y el gasto energético como consecuencia de un aumento del metabolismo celular. No obstante, todos los procesos anteriormente descritos están relacionados entre sí (Figura 38).

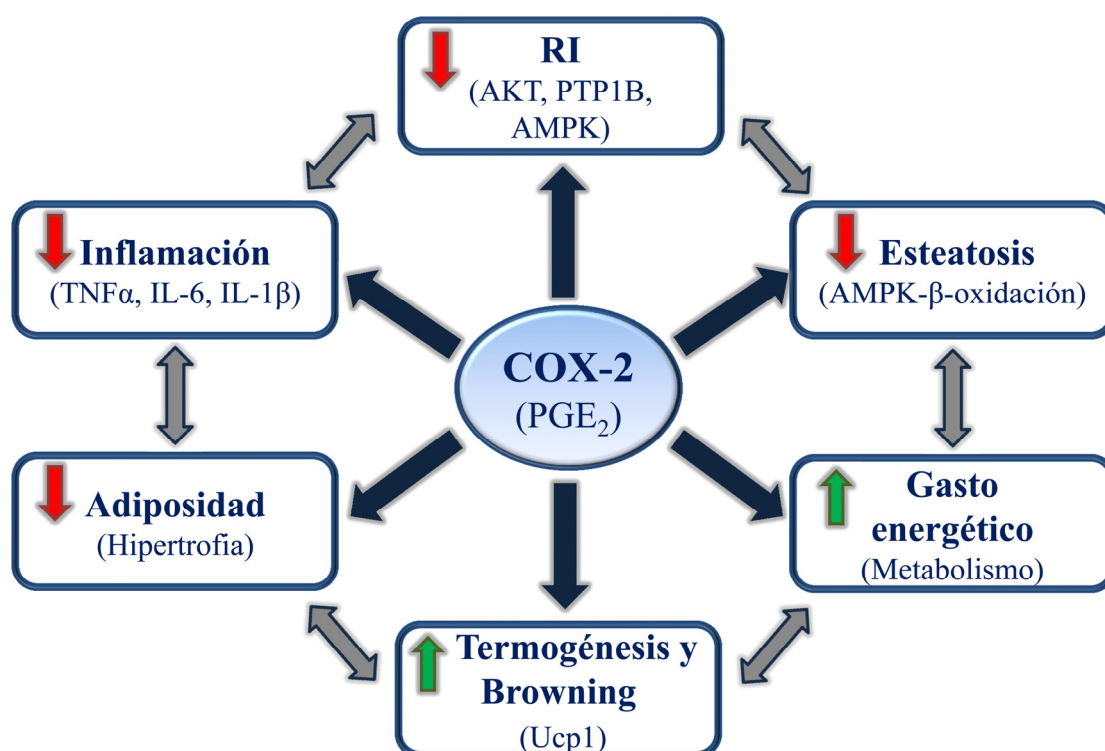


Figura 38. Las PGs dependientes de COX-2 regulan procesos claves en la fisiopatología de las enfermedades metabólicas como la obesidad y EHGNA.

La segunda parte de la tesis se centra en analizar la implicación de los miARNs en mecanismo molecular por el cual COX-2 regula la señalización de insulina. COX-2 reprime la expresión de miR-23b, miR-146b y miR-183 en células hepáticas mediante la estabilización y asociación con DDX-5, modulando así la actividad del complejo de procesamiento Drosha. Específicamente, hemos demostrado, junto con otros, que el miR-183 tiene como diana directa a IRS1 (149). Por lo tanto, la modulación de la expresión de miR-183 por COX-2 contribuye a la protección contra la RI mediante un incremento de los niveles de IRS1.

La biogénesis de los miARNs tiene múltiples puntos de regulación que conllevan a un aumento o disminución de su expresión (123). El complejo microprocesador de los miARNs, compuesto por Drosha, DGCR8, DDX5 y DDX17, controla el procesamiento de los pri-miARNs a pre-miARNs (52). Se ha demostrado que DDX5 y DDX17 pueden alterar la eficiencia en el procesamiento de diferentes miARNs, incrementado o reduciendo sus niveles de expresión (118, 128). Además de tener un papel importante en el procesamiento, DDX5 también regula los niveles de miARNs a nivel transcripcional (31). Se ha descrito previamente que DDX5 participa en la modulación del 35% de los pre-miARNs y miARNs maduros, sin cambios en los niveles de expresión los pri-miARNs (42). Por otro lado, DDX5 y DDX17 pueden interaccionar con otras proteínas, dando soporte para el reclutamiento de múltiples factores al complejo microprocesador (31, 135).

Trabajos previos han demostrado una relación entre la vía PI3K/AKT y DDX5. Por un lado, AKT es capaz de fosforilar a p300, aumentando su actividad acetiltransferasa (64), y por otro lado p300 acetila a DDX5, estabilizando su expresión (101). Nuestros resultados muestran que la inhibición farmacológica tanto de PI3K (LY294002) como de p300 (C646) dan lugar a una reducción en los niveles proteicos de DDX5 debida a una pérdida de estabilidad, indicando que el incremento de DDX5 mediado por COX2 es dependiente de PI3K/p300.

Se han estudiado con profundidad los mecanismos que regulan positivamente la expresión de los miARNs (74, 128), pero hasta el momento no se han caracterizado con detalle los mecanismos implicados en la modulación negativa de los miARNs. El regulador negativo mejor estudiado en la biogénesis de los miARNs es LIN28, que secuestra los pre-miARNs de la familia de let-7, evitando el procesamiento a través de Dicer (117). También, la

activación aberrante del factor transcripcional Myc conduce a una disminución de varios miARN, mediante la unión a sus regiones promotoras (25). Además, se han encontrado mutaciones en p53 en tumores humanos, de tal forma que p53 interfiere con el complejo Drosha/DDX5 que impide el procesamiento de los miARNs en el núcleo (128). Nuestros resultados muestran una regulación negativa del procesamiento de los miARNs ejercida por COX-2 a través de la estabilización de DDX5 y de la unión al complejo Drosha vía DDX5. Aunque la inhibición del procesamiento de los miARNs por COX-2 se produce por unión al complejo de Drosha a través de DDX5, el tratamiento de las células NCL-V con PGE₂ mimetiza el efecto de COX-2, regulando negativamente miR-23b, miR-146b y miR-183. Este hecho podría ser explicado porque resultados previos de nuestro laboratorio y de otros autores, han descrito que la PGE₂ induce la transcripción de COX-2 vía /PI3K/AKT (35, 105), y estabiliza la expresión de DDX5, favoreciendo la unión de COX-2 con el complejo microprocesador. En resumen, nuestros resultados indican que el mecanismo por el cual COX-2 inhibe el procesamiento de los miARNs es a través de la estabilización de DDX-5 vía PI3K/p300 y de su unión a Drosha a través de DDX5. Sugerimos que la interacción de COX-2 con el complejo de Drosha podría alterar el correcto posicionamiento del complejo en la estructura del miARN, modulando por tanto su actividad.

También, se ha realizado un análisis *in silico* de las vías de señalización en las que están implicados los genes diana de los miARNs regulados por COX-2. De entre las vías enriquecidas, hemos centrado nuestra atención en la señalización de la insulina en base a los resultados previos de nuestro laboratorio que indican que, COX-2 reduce el daño hepático producido por la hiperglucemia (40), y protege frente a la esteatosis, adiposidad, inflamación y RI en ratones sometidos a una dieta HFD. Se ha evaluado la expresión de los genes dianas, demostrando que estos genes están incrementados en el hígado de los ratones Tg, así como en células hepáticas CHL y NCL, que expresan COX-2 constitutivamente.

Estudios recientes sugieren que la expresión diferencial de los miARNs tiene un papel esencial en la regulación de procesos metabólicos, y está asociada tanto a procesos fisiológicos como patológicos, incluida la EHGA (18). Por ejemplo, Davalos y colaboradores indicaron que el miR-33a/b interviene en la regulación de la oxidación de los ácidos grasos, en el metabolismo de la glucosa y en la señalización de la insulina, a través de proteínas claves como Cpt1, AMPK e IRS2, entre otras (32). La expresión de miR-24, un

regulador negativo del gen *Insig1*, aparece elevada en el hígado de ratones tratados con una dieta HFD y en hepatocitos aislados humanos tratados con ácidos grasos produce esteatosis hepática e hiperlipidemia (103). Otro miARN, el miR-144, detectado en sangre, reduce la sensibilidad a la insulina mediante la modulación de IRS1 en el hígado de ratas y pacientes con DM (73). En contraposición, el miR-155 tiene un papel protector en el desarrollo de la EHGNA en ratones, regulando genes implicados en el metabolismo de lípidos (*Fasn*, *Cd36*) a través de LXR α (98). En este sentido, el miR-185 mejora la señalización de insulina (IRS2) mediante la inhibición del gen lipogénico *Srbp1* (143).

La RI hepática puede deberse en parte a la disrupción de la señalización de la insulina través de las proteínas IRS1 e IRS2, capaces de activar vías de señalización tan importantes como PI3K (124, 131). Resultados previos de nuestro laboratorio obtenidos usando ratones Tg indican que, aunque en el estadio diabético (hiperglucemia inducida por estreptozotocina) los ratones presentan una reducción de la actividad PI3K/AKT, ésta se mantiene significativamente elevada en los ratones Tg diabéticos comparado con los Wt (40). Hemos obtenido resultados similares en la presente tesis, donde los niveles de p-AKT están incrementados basalmente en las células hepáticas NCL-C y CHL-C y en el hígado de los animales Tg, comparado con la respectiva ausencia de COX-2 en los mismos modelos, gracias en parte a un incremento de IRS1.

Se ha demostrado que existe una correlación inversa entre la expresión de COX-2 y de los miARNs, y directa entre la expresión de COX-2 e IRS1 y DDX5, no solamente en los modelos *in vivo* e *in vitro*, también en las biopsias hepáticas humanas de pacientes con esteatosis no alcohólica, indicando que COX-2 podría representar una respuesta hepatoprotectora temprana frente a la lesión hepática producida en la EHGNA.

Todos estos datos indican un nuevo mecanismo por el cual COX-2 regula la expresión de los miARN. Las prostaglandinas generadas por COX-2 estabilizan la expresión de DDX5 a través de la activación de la vía PI3K/p300. A su vez, COX-2 se une al complejo Drosha/DGCR8, a través de DDX5, previniendo la conversión de los pri-miARN a pre-miARN. Esta asociación provoca una disminución de los niveles de miR-183 maduro, y en consecuencia, un incremento de los genes dianas, como IRS1, que producen un aumento de la señalización de la insulina (Figura 39).

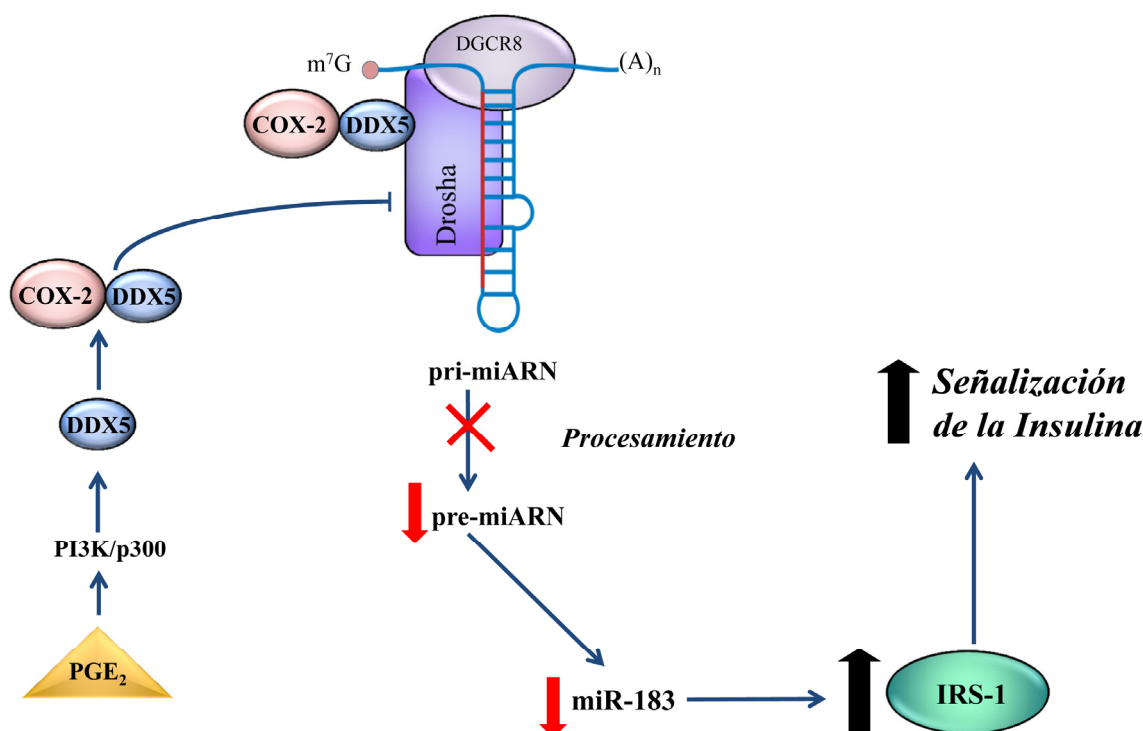


Figura 39. COX-2 incrementa la señalización de la vía de la insulina mediante la regulación negativa de miR-183.

La presente tesis demuestra que la expresión de COX-2 en el hepatocito protege frente RI hepática, siendo COX-2 una potencial diana terapéutica en las enfermedades metabólicas como la obesidad, EGHNA y DM, entre otras. Se han utilizado, en un modelo *in vivo*, análogos estables de PGE₂, como 16,16dmPGE₂, que simulan la expresión constitutiva de COX-2, demostrando que mejoran el gasto energético y disminuyen el tejido adiposo iWAT (89), por tanto podrían ser administrados para tratar la esteatosis y la RI en humanos. De hecho, se ha usado el análogo de PGE₂ (RS-86505-007) en un ensayo clínico, demostrando que reduce los lípidos y lipoproteínas plasmáticas en pacientes con hipercolesterolemia (76). Sin embargo, hay controversia en cuanto al efecto terapéutico del uso de AINEs. Hsieh y colaboradores han demostrado que la RI en tejido muscular y adiposo mejora en ratas alimentadas con dieta HFD o dieta rica en fructosa tratadas con celecoxib (63). De igual manera, Chen y colaboradores mostraron que el celecoxib reduce la esteatosis hepática y la inflamación en ratas alimentadas con una dieta HFD (26). En el ámbito clínico, dos estudios, uno con pacientes obesos y otro con pacientes sanos, demostraron que el celecoxib mejora la sensibilidad a la insulina (49, 50). Por el contrario, otros autores demuestran que el inhibidor selectivo de COX-2, NS-398, provoca un aumento de la RI (reducción de p-AkT) y de la

inflamación (incremento de TNF α e IL-6) inducida por palmitato en células musculares esqueléticas, y que el tratamiento con PGE₂ revierte dichos efectos (30). De igual manera, el celecoxib, reduce la esteatosis hepática y la RI a través de la inhibición de la ácido graso sintasa (Fasn) en ratas alimentadas con una dieta HFD. Sin embargo, los autores concluyen que la mejora en la esteatosis en el hígado se debe a efectos independientes de la inhibición de COX-2 (88). En este sentido, un estudio clínico demostró que el salicilato, un inhibidor de COX, atenúa la inflamación y mejora la homeostasis de la glucosa a través de la activación de AMPK en pacientes diabéticos tipo 2, independientemente de la inhibición de COX-2 (57). Por lo tanto, habría que profundizar en el estudio de los posibles efectos de la inhibición de COX-2 por parte de los AINEs en pacientes con obesidad, DM y EHGNA, teniendo especial precaución en cuanto al uso de dichos inhibidores en el tratamiento de estas patologías.

Los miARNs también pueden emplearse como diana terapéutica en múltiples patologías metabólicas. En general, existen dos aproximaciones para el desarrollo de la terapia con miARNs: antagonistas o moléculas miméticas de miARNs. Los antagonistas se unen al miARN endógeno e impiden la ganancia de función en situaciones fisiopatológicas; el segundo mimetiza al miARN restaurando la función que cumplía en la célula diana. Un estudio con miravirsén, un antagonista de miR-122, ha demostrado ser eficaz en primates infectados con VHC ya que pueden inhibir la biogénesis de miR-122 o impedir la unión del miARN al ARN viral en el hígado, reduciendo la replicación del VHC (48, 78). También se ha observado la misma efectividad en ensayos clínicos con pacientes con dicha infección viral, sin efectos adversos asociados al tratamiento con el antagonista (68). Sin embargo, la pérdida de la expresión de miR-122 está asociada a enfermedades metabólicas y CHC, ya que regula la homeostasis de los lípidos y la proliferación en el hígado, respectivamente. De hecho, el uso de análogos de miR-122 en modelos *in vivo* previene de las enfermedades del hígado (7). Otro estudio en fase preclínica llevado a cabo por Stoffel y colaboradores, indica una alta expresión de miR-103 y miR-107 en ratones obesos, mejorando la homeostasis de la glucosa y la sensibilidad a la insulina después del tratamiento con antagonista de estos miARNs (136). También, se ha demostrado que el antagonista de miR-133 reduce los niveles de LDL y aumenta de los niveles de HDL, reduciendo así los niveles de TGs en hígado y sangre en ratones y primates no humanos (102, 113, 114). Por tanto, en base a

nuestros resultados el uso del antagonista del miR-183 podría suponer una herramienta terapéutica para el tratamiento de la RI, síndromes metabólicos y EHGNA.

6. Conclusiones

Las conclusiones finales de esta tesis son las siguientes:

1. Las PGs producidas por la expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito de ratones protegen contra la obesidad, adiposidad y RI inducidas por el tratamiento con una dieta HFD durante 12 semanas mediante:

- ✓ Disminución de la esteatosis e inflamación en el tejido hepático.
- ✓ Mejora en la respuesta a la insulina, aumentando la relación pAkt/Akt en hígado tanto en condiciones basales como con una dieta HFD, además de disminuir PTP1B.
- ✓ Activación de AMPK y aumento en la β -oxidación mitocondrial en el hígado.
- ✓ Reducción de la masa e inflamación en el tejido adiposo.
- ✓ Aumento del gasto energético y termogénesis asociada a la diferenciación desde tejido adiposo blanco a marrón.

2. Las PGs derivadas de la expresión constitutiva de COX-2 en el hepatocito protegen frente a la RI, reduciendo la expresión de miR23b, miR-146b y miR-183 en células hepáticas mediante:

- ✓ Incremento de los niveles de DDX5, debido a una mayor estabilidad a través de la activación de la vía PI3K/AKT/p300.
- ✓ Modulación de la función enzimática de Drosha a través de la asociación física con DDX5.
- ✓ Mejora de la señalización de la insulina, incrementando la expresión del gen diana IRS1.

3. La expresión de COX-2 podría tener un papel hepatoprotector en pacientes con esteatosis hepática no alcohólica, por lo que COX-2 podría ser una buena diana terapéutica en las enfermedades metabólicas como la obesidad, EGHNA y DM, entre otras. Alternativamente, el uso de antagonistas de miARNs podría ser utilizado en el tratamiento de estas enfermedades.

7. Bibliografía

1. Accioly, M.T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C.M., Carrossini, N., Robbs, B.K., Oliveira, S.S., et al. (2008) Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer research*, **68**, 1732–40.
2. Agra Andrieu, N., Motiño, O., Mayoral, R., Llorente Izquierdo, C., Fernández-Alvarez, A., Boscá, L., et al. (2012) Cyclooxygenase-2 Is a Target of MicroRNA-16 in Human Hepatoma Cells. *PLoS ONE*, **7**.
3. Angulo, P. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease. *The New England journal of medicine*, **346**, 1221–31.
4. Anwar, A., John Anwar, I. and Delafontaine, P. (2015) Elevation of cardiovascular risk by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Trends in cardiovascular medicine*, March 12, 2015: 10.1016/j.tcm.2015.03.006.
5. Asaoka, Y., Terai, S., Sakaida, I. and Nishina, H. (2013) The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease. *Disease models & mechanisms*, **6**, 905–14.
6. Asrih, M. and Jornayvaz, F.R. (2013) Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *Journal of Endocrinology*, **218**, R25–R36.
7. Bandiera, S., Pfeffer, S., Baumert, T.F. and Zeisel, M.B. (2015) miR-122--a key factor and therapeutic target in liver disease. *Journal of hepatology*, **62**, 448–57.
8. Birkenfeld, A.L. and Shulman, G.I. (2014) Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 Diabetes. *Hepatology*, **59**, 713–723.
9. Botting, R.M. Vane's discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology. *Pharmacological reports : PR*, **62**, 518–25.
10. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, **72**, 248–54.
11. Callejas, N.A., Casado, M., Díaz-Guerra, M.J., Boscá, L. and Martín-Sanz, P. (2001) Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **33**, 860–7.
12. Canello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J.L., Hugol, D., et al. (2006) Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*, **55**, 1554–61.
13. Cao, J., Guo, T., Dong, Q., Zhang, J. and Li, Y. (2015) miR-26b is downregulated in human tongue squamous cell carcinoma and regulates cell proliferation and metastasis through a COX-2-dependent mechanism. *Oncology reports*, **33**, 974–80.

14. Casado, M., Callejas, N.A., Rodrigo, J., Zhao, X., Dey, S.K., Boscá, L., et al. (2001) Contribution of cyclooxygenase 2 to liver regeneration after partial hepatectomy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **15**, 2016–8.
15. Casado, M., Mollá, B., Roy, R., Fernández-Martínez, A., Cucarella, C., Mayoral, R., et al. (2007) Protection against Fas-induced liver apoptosis in transgenic mice expressing cyclooxygenase 2 in hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **45**, 631–8.
16. Castro-Sánchez, L., Agra, N., Llorente Izquierdo, C., Motiño, O., Casado, M., Boscá, L., et al. (2013) Regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **45**, 2501–2511.
17. Cebola, I. and Peinado, M.A. (2012) Epigenetic deregulation of the COX pathway in cancer. *Progress in lipid research*, **51**, 301–13.
18. Ceccarelli, S., Panera, N., Gnani, D. and Nobili, V. (2013) Dual role of microRNAs in NAFLD. *International journal of molecular sciences*, **14**, 8437–55.
19. Cervello, M., Bachvarov, D., Cusimano, A., Sardina, F., Azzolina, A., Lampiasi, N., et al. (2011) COX-2-dependent and COX-2-independent mode of action of celecoxib in human liver cancer cells. *Omics : a journal of integrative biology*, **15**, 383–92.
20. Cervello, M. and Montalto, G. (2006) Cyclooxygenases in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology : WJG*, **12**, 5113–21.
21. Cha, Y.I. and DuBois, R.N. (2007) NSAIDs and Cancer Prevention: Targets Downstream of COX-2. *Annual Review of Medicine*, **58**, 239–252.
22. Chakrabarty, A., Tranguch, S., Daikoku, T., Jensen, K., Furneaux, H. and Dey, S.K. (2007) MicroRNA regulation of cyclooxygenase-2 during embryo implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 15144–9.
23. Chandrasekharan, N. V, Dai, H., Roos, K.L.T., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., et al. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 13926–31.
24. Chandrasekharan, N. V and Simmons, D.L. (2004) The cyclooxygenases. *Genome biology*, **5**, 241.
25. Chang, T.-C., Yu, D., Lee, Y.-S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., et al. (2007) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature Genetics*, **40**, 43–50.
26. Chen, J., Liu, D., Bai, Q., Song, J., Guan, J., Gao, J., et al. Celecoxib attenuates liver steatosis and inflammation in non-alcoholic steatohepatitis induced by high-fat diet in rats. *Molecular medicine reports*, **4**, 811–6.

27. Clapp, L.H. and Gurung, R. (2015) The mechanistic basis of prostacyclin and its stable analogues in pulmonary arterial hypertension: Role of membrane versus nuclear receptors. *Prostaglandins & other lipid mediators*, **120**, 56–71.
28. Clària, J., González-Pérez, A., López-Vicario, C., Rius, B. and Titos, E. (2011) New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators. *Frontiers in immunology*, **2**, 49.
29. Cohen, J.C., Horton, J.D. and Hobbs, H.H. (2011) Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science (New York, N.Y.)*, **332**, 1519–23.
30. Coll, T., Palomer, X., Blanco-Vaca, F., Escolà-Gil, J.C., Sánchez, R.M., Laguna, J.C., et al. (2010) Cyclooxygenase 2 inhibition exacerbates palmitate-induced inflammation and insulin resistance in skeletal muscle cells. *Endocrinology*, **151**, 537–48.
31. Dardenne, E., Polay Espinoza, M., Fattet, L., Germann, S., Lambert, M.-P., Neil, H., et al. (2014) RNA Helicases DDX5 and DDX17 Dynamically Orchestrate Transcription, miRNA, and Splicing Programs in Cell Differentiation. *Cell Reports*, **7**, 1900–1913.
32. Dávalos, A., Goedeke, L., Smibert, P., Ramírez, C.M., Warriar, N.P., Andreo, U., et al. (2011) miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 9232–7.
33. Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G. and Hata, A. (2008) SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*, **454**, 56–61.
34. Dennis, E.A., Rhee, S.G., Billah, M.M. and Hannun, Y.A. (1991) Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **5**, 2068–77.
35. Dey, I., Lejeune, M. and Chadee, K. (2006) Prostaglandin E2 receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. *British journal of pharmacology*, **149**, 611–23.
36. Dixon, D.A., Blanco, F.F., Bruno, A. and Patrignani, P. (2013) Mechanistic aspects of COX-2 expression in colorectal neoplasia. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer*, **191**, 7–37.
37. Fernández-Martínez, A., Callejas, N.A., Casado, M., Boscá, L. and Martín-Sanz, P. (2004) Thioacetamide-induced liver regeneration involves the expression of cyclooxygenase 2 and nitric oxide synthase 2 in hepatocytes. *Journal of hepatology*, **40**, 963–70.
38. Ferreira, D.M.S., Simão, A.L., Rodrigues, C.M.P. and Castro, R.E. (2014) Revisiting the metabolic syndrome and paving the way for microRNAs in non-alcoholic fatty liver disease. *The FEBS journal*, **281**, 2503–24.

39. FitzGerald, G.A. (2003) COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nature reviews. Drug discovery*, **2**, 879–90.
40. Francés, D.E.A., Ingaramo, P.I., Mayoral, R., Través, P., Casado, M., Valverde, Á.M., et al. (2013) Cyclooxygenase-2 over-expression inhibits liver apoptosis induced by hyperglycemia. *Journal of cellular biochemistry*, **114**, 669–80.
41. Friedman, S.L. (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, **134**, 1655–69.
42. Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., et al. (2007) DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nature cell biology*, **9**, 604–11.
43. Gao, J.-H., Wen, S.-L., Yang, W.-J., Lu, Y.-Y., Tong, H., Huang, Z.-Y., et al. (2013) Celecoxib ameliorates portal hypertension of the cirrhotic rats through the dual inhibitory effects on the intrahepatic fibrosis and angiogenesis. *PloS one*, **8**, e69309.
44. Garcia, B., Martinez-de-Mena, R. and Obregon, M.-J. (2012) Arachidonic acid stimulates DNA synthesis in brown preadipocytes through the activation of protein kinase C and MAPK. *Biochimica et biophysica acta*, **1821**, 1309–15.
45. García-Alonso, V., López-Vicario, C., Titos, E., Morán-Salvador, E., González-Pérez, A., Rius, B., et al. (2013) Coordinate functional regulation between microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) and peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in the conversion of white-to-brown adipocytes. *The Journal of biological chemistry*, **288**, 28230–42.
46. García-Monzón, C., Lo Iacono, O., Mayoral, R., González-Rodríguez, Á., Miquilena-Colina, M.E., Lozano-Rodríguez, T., et al. (2011) Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Journal of Hepatology*, **54**, 142–152.
47. Garzon, R., Marcucci, G. and Croce, C.M. (2010) Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature reviews. Drug discovery*, **9**, 775–89.
48. Gebert, L.F.R., Rebhan, M.A.E., Crivelli, S.E.M., Denzler, R., Stoffel, M. and Hall, J. (2013) Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic Acids Research*, **42**, 609–621.
49. González-Ortiz, M., Martínez-Abundis, E., Balcázar-Muñoz, B.R. and Robles-Cervantes, J.A. (2001) Inhibition of cyclooxygenase-1 or -2 on insulin sensitivity in healthy subjects. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, **33**, 250–3.
50. González-Ortiz, M., Pascoe-González, S., Esperanzamartínez-Abundis, Kam-Ramos, A.M. and Hernández-Salazar, E. (2005) Effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, on insulin sensitivity, C-reactive protein, homocysteine, and metabolic profile in overweight or obese subjects. *Metabolic syndrome and related disorders*, **3**, 95–101.

51. González-Rodríguez, Á., Más-Gutiérrez, J.A., Mirasierra, M., Fernández-Pérez, A., Lee, Y.J., Ko, H.J., et al. (2012) Essential role of protein tyrosine phosphatase 1B in obesity-induced inflammation and peripheral insulin resistance during aging. *Aging Cell*, **11**, 284–296.
52. Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., et al. (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, **432**, 235–40.
53. Ha, M. and Kim, V.N. (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **15**, 509–524.
54. Ha, M. and Kim, V.N. (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **15**, 509–24.
55. Harper, K.A. and Tyson-Capper, A.J. (2008) Complexity of COX-2 gene regulation. *Biochemical Society transactions*, **36**, 543–5.
56. Hassan, K. (2014) Nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review of a growing epidemic. *World Journal of Gastroenterology*, **20**, 12082.
57. Hawley, S.A., Fullerton, M.D., Ross, F.A., Schertzer, J.D., Chevztzoff, C., Walker, K.J., et al. (2012) The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase. *Science (New York, N.Y.)*, **336**, 918–22.
58. Henkel, J., Frede, K., Schanze, N., Vogel, H., Schürmann, A., Spruss, A., et al. (2012) Stimulation of fat accumulation in hepatocytes by PGE α -dependent repression of hepatic lipolysis, β -oxidation and VLDL-synthesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **92**, 1597–606.
59. Henkel, J., Neuschäfer-Rube, F., Pathe-Neuschäfer-Rube, A. and Püschel, G.P. (2009) Aggravation by prostaglandin E2 of interleukin-6-dependent insulin resistance in hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **50**, 781–90.
60. Hortelano, S., Zeini, M., Casado, M., Martín-Sanz, P. and Boscá, L. (2007) Animal models for the study of liver regeneration: role of nitric oxide and prostaglandins. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **12**, 13–21.
61. Hotamisligil, G.S. (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, **444**, 860–7.
62. Hsieh, P.-S., Jin, J.-S., Chiang, C.-F., Chan, P.-C., Chen, C.-H. and Shih, K.-C. (2009) COX-2-mediated inflammation in fat is crucial for obesity-linked insulin resistance and fatty liver. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, **17**, 1150–7.
63. Hsieh, P.-S., Tsai, H.-C., Kuo, C.-H., Chan, J.Y.-H., Shyu, J.-F., Cheng, W.-T., et al. (2008) Selective COX2 inhibition improves whole body and muscular insulin resistance in fructose-fed rats. *European journal of clinical investigation*, **38**, 812–9.

64. Huang, W.-C. and Chen, C.-C. (2005) Akt phosphorylation of p300 at Ser-1834 is essential for its histone acetyltransferase and transcriptional activity. *Molecular and cellular biology*, **25**, 6592–602.
65. Hui, A.Y., Dannenberg, A.J., Sung, J.J.Y., Subbaramaiah, K., Du, B., Olinga, P., et al. (2004) Prostaglandin E2 inhibits transforming growth factor beta 1-mediated induction of collagen alpha 1(I) in hepatic stellate cells. *Journal of hepatology*, **41**, 251–8.
66. Hui, A.Y., Leung, W.K., Chan, H.L.Y., Chan, F.K.L., Go, M.Y.Y., Chan, K.K., et al. (2006) Effect of celecoxib on experimental liver fibrosis in rat. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*, **26**, 125–36.
67. Iñiguez, M.A., Cacheiro-Llaguno, C., Cuesta, N., Díaz-Muñoz, M.D. and Fresno, M. (2008) Prostanoid function and cardiovascular disease. *Archives of physiology and biochemistry*, **114**, 201–9.
68. Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., et al. (2013) Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England journal of medicine*, **368**, 1685–94.
69. Jing, Q., Huang, S., Guth, S., Zarubin, T., Motoyama, A., Chen, J., et al. (2005) Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*, **120**, 623–34.
70. Justice, E. and Carruthers, D.M. (2005) Cardiovascular risk and COX-2 inhibition in rheumatological practice. *Journal of human hypertension*, **19**, 1–5.
71. Kahn, S.E., Hull, R.L. and Utzschneider, K.M. (2006) Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, **444**, 840–6.
72. Kang, Y.-J., Mbonye, U.R., DeLong, C.J., Wada, M. and Smith, W.L. (2007) Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Progress in Lipid Research*, **46**, 108–125.
73. Karolina, D.S., Armugam, A., Tavintharan, S., Wong, M.T.K., Lim, S.C., Sum, C.F., et al. (2011) MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PloS one*, **6**, e22839.
74. Kawai, S. and Amano, A. (2012) BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *The Journal of Cell Biology*, **197**, 201–208.
75. Kleiner, D.E., Brunt, E.M., Van Natta, M., Behling, C., Contos, M.J., Cummings, O.W., et al. (2005) Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **41**, 1313–21.
76. Korhonen, T., Savolainen, M.J., Jääskeläinen, T. and Kesäniemi, Y.A. (1995) Effect of a synthetic prostaglandin E2 analogue, RS-86505-007, on plasma lipids and lipoproteins in patients with moderate hypercholesterolaemia: efficacy and tolerance of treatment and response in different apolipoprotein polymorphism groups. *European journal of clinical pharmacology*, **48**, 97–102.

77. Krol, J., Loedige, I. and Filipowicz, W. (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature reviews. Genetics*, **11**, 597–610.
78. Lanford, R.E., Hildebrandt-Eriksen, E.S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M.E., et al. (2010) Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science (New York, N.Y.)*, **327**, 198–201.
79. Lee, J.-S. and Thorgeirsson, S.S. (2002) Functional and genomic implications of global gene expression profiles in cell lines from human hepatocellular cancer. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **35**, 1134–43.
80. Lee, W.J., Kim, M., Park, H.-S., Kim, H.S., Jeon, M.J., Oh, K.S., et al. (2006) AMPK activation increases fatty acid oxidation in skeletal muscle by activating PPAR α and PGC-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **340**, 291–295.
81. Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S. and Kim, V.N. (2002) MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*, **21**, 4663–70.
82. Li, G., Han, C., Xu, L., Lim, K., Isse, K. and Wu, T. (2009) Cyclooxygenase-2 prevents fas-induced liver injury through up-regulation of epidermal growth factor receptor. *Hepatology*, **50**, 834–843.
83. Lin, S. and Gregory, R.I. (2015) MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, **15**, 321–333.
84. Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, **25**, 402–8.
85. Llorens, O., Perez, J.J., Palomer, A. and Mauleon, D. (1999) Structural basis of the dynamic mechanism of ligand binding to cyclooxygenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **9**, 2779–2784.
86. Llorente Izquierdo, C., Mayoral, R., Flores, J.M., García-Palencia, P., Cucarella, C., Boscá, L., et al. (2011) Transgenic mice expressing cyclooxygenase-2 in hepatocytes reveal a minor contribution of this enzyme to chemical hepatocarcinogenesis. *The American journal of pathology*, **178**, 1361–73.
87. Llorente-Izquierdo, C., Mayoral, R., Cucarella, C., Grau, C., Alvarez, M.S., Flores, J.M., et al. (2013) Progression of liver oncogenesis in the double transgenic mice c-myc/TGF α is not enhanced by cyclooxygenase-2 expression. *Prostaglandins & other lipid mediators*, **106**, 106–15.
88. Lu, S. and Archer, M.C. (2007) Celecoxib decreases fatty acid synthase expression via down-regulation of c-Jun N-terminal kinase-1. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, **232**, 643–53.
89. Madsen, L., Pedersen, L.M., Lillefosse, H.H., Fjaere, E., Bronstad, I., Hao, Q., et al. (2010) UCP1 induction during recruitment of brown adipocytes in white adipose tissue is dependent on cyclooxygenase activity. *PloS one*, **5**, e11391.

90. Malarkey, D.E., Johnson, K., Ryan, L., Boorman, G. and Maronpot, R.R. (2005) New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicologic pathology*, **33**, 27–34.
91. Martín Sanz, P., Hortelano, S., Bosca, L. and Casado, M. (2006) Cyclooxygenase 2: understanding the pathophysiological role through genetically altered mouse models. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **11**, 2876–88.
92. Martín-Sanz, P., Callejas, N.A., Casado, M., Díaz-Guerra, M.J. and Bosca, L. (1998) Expression of cyclooxygenase-2 in foetal rat hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines. *British journal of pharmacology*, **125**, 1313–9.
93. Martín-Sanz, P., Mayoral, R., Casado, M. and Bosca, L. (2010) COX-2 in liver, from regeneration to hepatocarcinogenesis: what we have learned from animal models? *World journal of gastroenterology : WJG*, **16**, 1430–5.
94. Mayoral, R., Mollá, B., Flores, J.M., Bosca, L., Casado, M. and Martín-Sanz, P. (2008) Constitutive expression of cyclo-oxygenase 2 transgene in hepatocytes protects against liver injury. *The Biochemical journal*, **416**, 337–46.
95. Mbonye, U.R., Wada, M., Rieke, C.J., Tang, H.-Y., Dewitt, D.L. and Smith, W.L. (2006) The 19-amino acid cassette of cyclooxygenase-2 mediates entry of the protein into the endoplasmic reticulum-associated degradation system. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 35770–8.
96. Menter, D.G., Schilsky, R.L. and DuBois, R.N. (2010) Cyclooxygenase-2 and cancer treatment: understanding the risk should be worth the reward. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, **16**, 1384–90.
97. Michaux, C. and Charlier, C. (2004) Structural approach for COX-2 inhibition. *Mini reviews in medicinal chemistry*, **4**, 603–15.
98. Miller, A.M., Gilchrist, D.S., Nijjar, J., Araldi, E., Ramirez, C.M., Lavery, C.A., et al. (2013) MiR-155 has a protective role in the development of non-alcoholic hepatosteatosis in mice. *PloS one*, **8**, e72324.
99. Minokoshi, Y., Kim, Y.-B., Peroni, O.D., Fryer, L.G.D., Müller, C., Carling, D., et al. (2002) Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature*, **415**, 339–43.
100. Miquilena-Colina, M.E., Lima-Cabello, E., Sanchez-Campos, S., Garcia-Mediavilla, M. V., Fernandez-Bermejo, M., Lozano-Rodriguez, T., et al. (2011) Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*, **60**, 1394–1402.
101. Mooney, S.M., Goel, A., D'Assoro, A.B., Salisbury, J.L. and Janknecht, R. (2010) Pleiotropic effects of p300-mediated acetylation on p68 and p72 RNA helicase. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 30443–52.

102. Najafi-Shoushtari, S.H., Kristo, F., Li, Y., Shioda, T., Cohen, D.E., Gerszten, R.E., et al. (2010) MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science (New York, N.Y.)*, **328**, 1566–9.
103. Ng, R., Wu, H., Xiao, H., Chen, X., Willenbring, H., Steer, C.J., et al. (2014) Inhibition of microRNA-24 expression in liver prevents hepatic lipid accumulation and hyperlipidemia. *Hepatology*, **60**, 554–564.
104. Núñez, O., Fernández-Martínez, A., Majano, P.L., Apolinario, A., Gómez-Gonzalo, M., Benedicto, I., et al. (2004) Increased intrahepatic cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 expression is associated with progressive liver disease in chronic hepatitis C virus infection: role of viral core and NS5A proteins. *Gut*, **53**, 1665–72.
105. Obermajer, N. and Kalinski, P. (2014) Key role of the positive feedback between PGE 2 and COX2 in the biology of myeloid-derived suppressor cells. *OncImmunology*, **1**, 762–764.
106. Olefsky, J.M. (2008) Fat Talks, Liver and Muscle Listen. *Cell*, **134**, 914–916.
107. Omar, B., Pacini, G. and Ahrén, B. (2012) Differential development of glucose intolerance and pancreatic islet adaptation in multiple diet induced obesity models. *Nutrients*, **4**, 1367–81.
108. Paik, Y.-H., Kim, J.K., Lee, J.I., Kang, S.H., Kim, D.Y., An, S.H., et al. (2009) Celecoxib induces hepatic stellate cell apoptosis through inhibition of Akt activation and suppresses hepatic fibrosis in rats. *Gut*, **58**, 1517–27.
109. Parekh, P.I., Petro, A.E., Tiller, J.M., Feinglos, M.N. and Surwit, R.S. (1998) Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. *Metabolism: clinical and experimental*, **47**, 1089–96.
110. Parfenova, H., Parfenov, V.N., Shlopov, B. V, Levine, V., Falkos, S., Pourcyrous, M., et al. (2001) Dynamics of nuclear localization sites for COX-2 in vascular endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, **281**, C166–78.
111. Pepini, T., Gorbunova, E.E., Gavrilovskaya, I.N., Mackow, J.E. and Mackow, E.R. (2010) Andes virus regulation of cellular microRNAs contributes to hantavirus-induced endothelial cell permeability. *Journal of virology*, **84**, 11929–36.
112. Polyzos, S.A., Kountouras, J. and Mantzoros, C.S. (2015) Leptin in nonalcoholic fatty liver disease: a narrative review. *Metabolism: clinical and experimental*, **64**, 60–78.
113. Rayner, K.J., Sheedy, F.J., Esau, C.C., Hussain, F.N., Temel, R.E., Parathath, S., et al. (2011) Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*, **121**, 2921–31.
114. Rayner, K.J., Esau, C.C., Hussain, F.N., McDaniel, A.L., Marshall, S.M., van Gils, J.M., et al. (2011) Inhibition of miR-33a/b in non-human primates raises plasma HDL and lowers VLDL triglycerides. *Nature*, **478**, 404–407.

115. Rizzo, M.T. (2011) Cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **412**, 671–87.
116. Rouzer, C.A. and Marnett, L.J. (2009) Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of lipid research*, **50 Suppl**, S29–34.
117. Rybak, A., Fuchs, H., Smirnova, L., Brandt, C., Pohl, E.E., Nitsch, R., et al. (2008) A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nature cell biology*, **10**, 987–93.
118. Sakamoto, S., Aoki, K., Higuchi, T., Todaka, H., Morisawa, K., Tamaki, N., et al. (2009) The NF90-NF45 complex functions as a negative regulator in the microRNA processing pathway. *Molecular and cellular biology*, **29**, 3754–69.
119. Saltiel, A.R. and Kahn, C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**, 799–806.
120. Samuelsson, B., Morgenstern, R. and Jakobsson, P.-J. (2007) Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target. *Pharmacological reviews*, **59**, 207–24.
121. Scher, J.U. and Pillinger, M.H. (2009) The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research*, **57**, 703–8.
122. Semple, R.K., Sleight, A., Murgatroyd, P.R., Adams, C.A., Bluck, L., Jackson, S., et al. (2009) Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. *The Journal of clinical investigation*, **119**, 315–22.
123. Shen, J. and Hung, M.-C. (2015) Signaling-mediated regulation of MicroRNA processing. *Cancer research*, **75**, 783–91.
124. Shimomura, I., Matsuda, M., Hammer, R.E., Bashmakov, Y., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (2000) Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Molecular cell*, **6**, 77–86.
125. Shoelson, S.E., Herrero, L. and Naaz, A. (2007) Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology*, **132**, 2169–80.
126. Simmons, D.L. (2004) Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews*, **56**, 387–437.
127. Strillacci, A., Griffoni, C., Sansone, P., Paterini, P., Piazzzi, G., Lazzarini, G., et al. (2009) MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. *Experimental cell research*, **315**, 1439–47.
128. Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S. and Miyazono, K. (2009) Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, **460**, 529–33.

129. Tanabe, T. and Tohnai, N. (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & other lipid mediators*, **68-69**, 95–114.
130. Tanaka, T., Haneda, S., Imakawa, K., Sakai, S. and Nagaoka, K. (2009) A microRNA, miR-101a, controls mammary gland development by regulating cyclooxygenase-2 expression. *Differentiation*, **77**, 181–187.
131. Taniguchi, C.M., Ueki, K. and Kahn, R. (2005) Complementary roles of IRS-1 and IRS-2 in the hepatic regulation of metabolism. *The Journal of clinical investigation*, **115**, 718–27.
132. Thanan, R., Murata, M., Ma, N., Hammam, O., Wishahi, M., El Leithy, T., et al. (2012) Nuclear localization of COX-2 in relation to the expression of stemness markers in urinary bladder cancer. *Mediators of inflammation*, **2012**, 165879.
133. Tian, Y.-F., Hsia, T.-L., Hsieh, C.-H., Huang, D.-W., Chen, C.-H. and Hsieh, P.-S. (2011) The importance of cyclooxygenase 2-mediated oxidative stress in obesity-induced muscular insulin resistance in high-fat-fed rats. *Life sciences*, **89**, 107–14.
134. Tilg, H. and Moschen, A.R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, **14**, 222–31.
135. Trabucchi, M., Briata, P., Filipowicz, W., Rosenfeld, M.G., Ramos, A. and Gherzi, R. How to control miRNA maturation? *RNA biology*, **6**, 536–40.
136. Trajkovski, M., Hausser, J., Soutschek, J., Bhat, B., Akin, A., Zavolan, M., et al. (2011) MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature*, **474**, 649–653.
137. Trusca, V.G., Fuior, E.V., Florea, I.C., Kardassis, D., Simionescu, M. and Gafencu, A.V. (2011) Macrophage-specific up-regulation of apolipoprotein E gene expression by STAT1 is achieved via long range genomic interactions. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 13891–904.
138. Valverde, A.M., Burks, D.J., Fabregat, I., Fisher, T.L., Carretero, J., White, M.F., et al. (2003) Molecular mechanisms of insulin resistance in IRS-2-deficient hepatocytes. *Diabetes*, **52**, 2239–48.
139. VanSaun, M.N., Lee, I.K., Washington, M.K., Matrisian, L. and Gorden, D.L. (2009) High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. *The American journal of pathology*, **175**, 355–64.
140. Vegiopoulos, A., Muller-Decker, K., Strzoda, D., Schmitt, I., Chichelnitskiy, E., Ostertag, A., et al. (2010) Cyclooxygenase-2 Controls Energy Homeostasis in Mice by de Novo Recruitment of Brown Adipocytes. *Science*, **328**, 1158–1161.
141. Wang, D. and Dubois, R.N. (2010) Eicosanoids and cancer. *Nature reviews. Cancer*, **10**, 181–93.

142. Wang, D. and DuBois, R.N. (2013) The role of anti-inflammatory drugs in colorectal cancer. *Annual review of medicine*, **64**, 131–44.
143. Wang, X.-C., Zhan, X.-R., Li, X.-Y., Yu, J.-J. and Liu, X.-M. (2014) MicroRNA-185 regulates expression of lipid metabolism genes and improves insulin sensitivity in mice with non-alcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG*, **20**, 17914–23.
144. Wen, S.-L., Gao, J.-H., Yang, W.-J., Lu, Y.-Y., Tong, H., Huang, Z.-Y., et al. (2014) Celecoxib attenuates hepatic cirrhosis through inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition of hepatocytes. *Journal of gastroenterology and hepatology*, **29**, 1932–42.
145. Williams, C.S. and DuBois, R.N. (1996) Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *The American journal of physiology*, **270**, G393–400.
146. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I. and Diederichs, S. (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, **11**, 228–34.
147. Woodward, D.F., Jones, R.L. and Narumiya, S. (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacological reviews*, **63**, 471–538.
148. Wree, A., Kahraman, A., Gerken, G. and Canbay, A. (2011) Obesity affects the liver - the link between adipocytes and hepatocytes. *Digestion*, **83**, 124–33.
149. Xu, J. and Wong, C. (2008) A computational screen for mouse signaling pathways targeted by microRNA clusters. *RNA (New York, N.Y.)*, **14**, 1276–83.
150. Yamamoto, H., Kondo, M., Nakamori, S., Nagano, H., Wakasa, K.-I., Sugita, Y., et al. (2003) JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology*, **125**, 556–71.
151. Yamauchi, T., Kamon, J., Minokoshi, Y., Ito, Y., Waki, H., Uchida, S., et al. (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature medicine*, **8**, 1288–95.
152. Yamauchi, T., Kamon, J., Waki, H., Terauchi, Y., Kubota, N., Hara, K., et al. (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature medicine*, **7**, 941–6.
153. Yoon, M.J., Lee, G.Y., Chung, J.-J., Ahn, Y.H., Hong, S.H. and Kim, J.B. (2006) Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes*, **55**, 2562–70.
154. Young, L.E., Moore, A.E., Sokol, L., Meisner-Kober, N. and Dixon, D.A. (2012) The mRNA stability factor HuR inhibits microRNA-16 targeting of COX-2. *Molecular cancer research : MCR*, **10**, 167–80.

155. Yu, J., Wu, C.W., Chu, E.S.H., Hui, A.Y., Cheng, A.S.L., Go, M.Y.Y., et al. (2008) Elucidation of the role of COX-2 in liver fibrogenesis using transgenic mice. *Biochemical and biophysical research communications*, **372**, 571–7.
156. Yue, X., Yang, F., Yang, Y., Mu, Y., Sun, W., Li, W., et al. (2011) Induction of cyclooxygenase-2 expression by hepatitis B virus depends on demethylation-associated recruitment of transcription factors to the promoter. *Virology journal*, **8**, 118.
157. Zabolotny, J.M., Kim, Y.-B., Welsh, L.A., Kershaw, E.E., Neel, B.G. and Kahn, B.B. (2008) Protein-tyrosine Phosphatase 1B Expression Is Induced by Inflammation in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, **283**, 14230–14241.
158. Zeini, M., Hortelano, S., Través, P.G., Martín-Sanz, P. and Boscá, L. (2004) Simultaneous abrogation of NOS-2 and COX-2 activities is lethal in partially hepatectomised mice. *Journal of hepatology*, **40**, 926–33.
159. Zhang, W., Zhang, X., Wang, H., Guo, X., Li, H., Wang, Y., et al. (2012) AMP-Activated Protein Kinase 1 Protects Against Diet-Induced Insulin Resistance and Obesity. *Diabetes*, **61**, 3114–3125.
160. Zhang, Y., Desai, A., Yang, S.Y., Bae, K.B., Antczak, M.I., Fink, S.P., et al. (2015) TISSUE REGENERATION. Inhibition of the prostaglandin-degrading enzyme 15-PGDH potentiates tissue regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, **348**, aaa2340.
161. Yamada, T. (ed) (2009) Atlas of Gastroenterology. Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

Los resultados de la presente tesis están plasmados en dos artículos recientemente publicados, titulados:

Francés, D.E., **Motino, O.**, Agrá, N., González-Rodríguez, Á., Fernández-Álvarez, A., Cucarella, C., et al. (2015) Hepatic cyclooxygenase-2 expression protects against diet-induced steatosis, obesity, and insulin resistance. *Diabetes*, 64, 1522–31.

Motino, O., Francés, D.E., Mayoral, R., Castro-Sánchez, L., Fernández-Velasco, M., Boscá, L., et al. (2015) Regulation of MicroRNA 183 by Cyclooxygenase 2 in Liver Is DEAD-Box Helicase p68 (DDX5) Dependent: Role in Insulin Signaling. *Molecular and cellular biology*, 35, 2554–67.

Además, durante el transcurso de la tesis se han publicado dos artículos titulados:

Agra Andrieu, N., **Motino, O.**, Mayoral, R., Llorente Izquierdo, C., Fernández-Alvarez, A., Boscá, L., et al. (2012) Cyclooxygenase-2 Is a Target of MicroRNA-16 in Human Hepatoma Cells. *PLoS ONE*, 7.

Castro-Sánchez, L., Agra, N., Llorente Izquierdo, C., **Motino, O.**, Casado, M., Boscá, L., et al. (2013) Regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in hepatocellular carcinoma. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45, 2501–2511.

También, se han realizado dos artículos durante la tesis en los que el doctorando ha participado, titulados:

Lambertucci, F., **Motino, O.**, Villar, S., Rigalli J.P., et al. Novel effect of benznidazole, a drug used for treatment of Chagas' disease, on Nrf2 hepatic induction, redox status and TLR4 modulation during sepsis in mice. *Free Radic Biol Med*. En revisión.

Motino, O., Agra, N., Brea R., et al. Cyclooxygenase-2 expression in hepatocytes attenuates non-alcoholic steatohepatitis and CCl4-induced liver fibrosis in mice. En preparación.

